

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Aplicación biotecnológica de bacterias rizosféricas: elicitación de
sistemas defensivos sistémicos en relación con la producción de
compuestos con interés farmacológico y alimentario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Javier Gutiérrez Mañero

Directores

María Soledad Martín Gómez
María Dolores Saco Sierra

Madrid, 2016

Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

**APLICACIÓN BIOTECNOLOGICA DE BACTERIAS
RIZOSFÉRICAS: ELICITACION DE SISTEMAS DEFENSIVOS
SISTÉMICOS EN RELACION CON LA PRODUCCION DE
COMPUESTOS CON INTERÉS FARMACOLOGICO Y
ALIMENTARIO**

Tesis Doctoral
Francisco Javier Gutiérrez Mañero

APLICACIÓN BIOTECNOLOGICA DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS:
ELICITACION DE SISTEMAS DEFENSIVOS SISTÉMICOS EN RELACION
CON LA PRODUCCION DE COMPUESTOS CON INTERÉS
FARMACOLOGICO Y ALIMENTARIO

Memoria presentada por
Francisco Javier Gutiérrez Mañero
para optar al grado de Doctor

VºBº de las directoras de la tesis:

Dra. María Soledad Martín Gómez

Dra. María Dolores Saco Sierra

Francisco Javier Gutiérrez Mañero

Índice

	<u>Página</u>
Resumen	1
Summary	3
Capítulo 1. Introducción	5
1.1 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y elicitación de plantas con interés farmacéutico.....	10
1.1.1 Mecanismos de acción de las PGPR.....	13
1.1.2 Inducción de Resistencia Sistémica.....	14
1.2 Inducción del metabolismo secundario: Elicitación.....	19
1.2.1 Mecanismos de elicitación y factores que influyen en la elicitación.....	20
1.2.2 Aplicación de la tecnología de elicitación para la producción de metabolitos con interés farmacológico.....	21
1.3. Plan de trabajo y objetivos general.....	26
1.4 Bibliografía.....	28
Capítulo 2. Artículos científicos	39
2.1 Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of <i>Nicotiana glauca</i> enhance growth and induce systemic resistance in <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	43
2.2 Elicitation of systemic resistance and growth promotion of <i>Arabidopsis thaliana</i> by PGPRs from <i>Nicotiana glauca</i> : a study of the putative induction pathway.....	61
2.3 Elicitation of secondary metabolism in <i>Hypericum perforatum</i> by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures.....	75
2.4 La elicitación bacteriana como herramienta biotecnológica para la producción de alimento funcional de alto contenido en isoflavonas a partir de semillas de <i>Glycine max</i> cv. Osumi.....	97
Capítulo 3. Discusion general	121
Capítulo 4. Conclusiones	139
Capítulo 5. Bibliografía general	143

Anexo 1. Publicaciones

Esta memoria se basa en la hipótesis del papel fundamental que el sistema microbiano asociado al sistema radical de las plantas tiene sobre el metabolismo vegetal y las consiguientes aplicaciones de los productos derivados del mismo. El sistema rizosférico microbiano, el microbioma rizosférico cumple un papel fundamental para que la planta consiga mejorar sus capacidades de adaptación a un ambiente cambiante. En el capítulo 2 se exponen de manera enlazadas hipótesis sucesivas que pretenden evidenciar el potencial de aplicación de las bacterias asociadas a la planta y los distintos enfoques de aplicación biotecnológicos.

En primer lugar, se plantea el uso de la rizosfera como fuente de microorganismos especialmente adaptados a la interacción del sistema planta/microorganismos. Un sistema en el que la presión selectiva definida por la planta condiciona el tipo de microorganismos, su diversidad y en definitiva la estructura de las comunidades microbianas que se desarrollan en este ecosistema. Sobre la hipótesis de la capacidad de selección de microorganismos por la planta, primero se busca una planta que aporte una serie de factores de presión-selección. La planta se elige en base a criterios filogenéticos y metabólicos (metabolismo secundario muy activo). *Nicotiana glauca*, es una Solanacea, de la misma familia que especies con gran interés alimentario, como el tomate, *Solanum lycopersicum*, la patata, *Solanum tuberosum* o el pimiento, *Capsicum annum*. Se selecciona esta planta como sujeto de muestreo rizosférico, en busca de un microbioma cultivable y con aplicaciones por sus aportaciones beneficiosas en la interacción. A continuación, sobre las casi mil cepas aisladas de la rizosfera, a lo largo de dos años, en tres suelos de características muy diferentes, se realiza un ensayo previo de actividades con potencial para incidir favorablemente sobre la salud de la planta. Las cepas se seleccionan sobre la base de un screening a gran escala en el que se intenta absorber la máxima variabilidad genética de los microorganismos que se desarrollan en el sistema rizosférico de *Nicotiana glauca* y pasan a estudiarse por su capacidad para inducir resistencia sistémica y efectos sobre el crecimiento en plantas de tomate, especie elegida como modelo de trabajo.

En una segunda etapa, descrita en el apartado 2.2, una vez comprobada la capacidad de las cepas seleccionadas para proteger a las plantas del ataque de un patógeno modelo, se estudian los factores desencadenantes de la respuesta, y cómo ocurre la transducción de la señal a nivel fisiológico en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El conocimiento de los factores capaces de disparar una respuesta defensiva en una planta son fundamentales para el posterior manejo de la misma.

La demostración de una respuesta defensiva sistémica mediada por una transducción de señales, con las implicaciones indicadas, permite abordar en los dos siguientes apartados (2.3 y 2.4) la aplicación de las cepas, de los MAMPs y de los efectores o elicitores metabólicos en la inducción de respuestas mediadas por metabolitos secundarios. Las especies seleccionadas para estudiar el efecto de las bacterias rizosféricas sobre el metabolismo

secundario fueron *Hypericum perforatum* y *Glicine max*. El desarrollo de estos dos apartados está orientado, por una parte a comprobar la capacidad de las cepas bacterianas o sus elicitores para desencadenar respuestas en otras especies, por otra a comenzar la identificación de los elicitores, estructurales o metabólicos y por último a determinar la tecnología de aplicación adecuada ya sea en planta o en cultivos celulares.

Los resultados obtenidos en estos dos apartados nos permite, por una parte, proponer la rizosfera de *N. glauca* como fuente de microorganismos seleccionados por la planta que podrían ser candidatos para los fines propuestos (inducción del metabolismo defensivo y/o la mejora general del crecimiento, promoción del crecimiento), y por otra parte, proponer como método estructurado de trabajo la selección de bacterias rizosféricas como fuente de bioefectores capaces de alterar el metabolismo secundario de las plantas en relación con sus sistemas defensivos y su aprovechamiento para mejorar tanto su capacidad defensiva y adaptativa como sus características nutricionales.

The present study focuses on the microbial system associated to plant roots, its key role on plant metabolism and the direct applications to obtain derived products. The rhizosphere microbiome dramatically affects the metabolic changes relevant for plant adaptations to environmental changes. The results presented on chapter 2 arise from consecutive hypothesis that progressively evidence the huge potential of delivering natural beneficial bacteria to plants for different biotechnological applications.

The type of microorganisms and diversity of the same present in the rhizosphere of a plant is determined by the plant through a number of factors, among which are phylogenetic and metabolic criteria. Based on this statement, *Nicotiana glauca*, was identified as a good candidate to provide beneficial microorganisms for two reasons; first, this genera has an active secondary metabolism. Secondly, it has a phylogenetic relationship with other species relevant for human nutrition such as tomatoes, (*Solanum lycopersicum*), potatoes, (*Solanum tuberosum*) or peppers (*Capsicum annum*) since it belongs to the Solanaceae family. Hence, a screening for PGPR was carried out within the culturable microbiome in order to isolate bacterial strains with a good biotechnological potential. The screening was designed along two years, on three different soils and two phenological moments of the plant in order to absorb the maximum genetic variability of the microorganisms that inhabit the rhizosphere of *Nicotiana glauca*. The screening for putative PGPR traits was done on 1000 isolates based on biochemical tests, and the best six strains are further evaluated for their ability to enhance growth and induce systemic resistance on tomato as the model plant.

Once the most effective strains to trigger systemic resistance in tomato are identified, a basic study of the molecular factors involved in the response and the mechanisms of signal transduction are studied in the model plant *Arabidopsis thaliana* in the second block.

Upon evidence that the systemic protection achieved is mediated through signal transduction, the next two experimental blocks (2.3 and 2.4) are approached. In these, the effective strains and its MAMPs, effectors, or metabolic elicitors are delivered to different plant species with an active secondary metabolism relevant for human health, *Hypericum perforatum* and *Glycine max*. A similar objective is set for these two species, on one hand, to evaluate the ability of these strains or their elicitors, to trigger a systemic response in a different plant species, and in the other hand, to initiate the identification process of the elicitors in order to develop the technology to deliver these to plants and/or cell cultures. Results from these experiments confirm that the rhizosphere of *N. glauca* is an excellent source of specialized microorganisms to achieve the proposed objectives (improve plant fitness and trigger secondary metabolism). Secondly, the series of consecutive hypothesis followed in this memory can be proposed as a good method to obtain effective strains to provide bioeffectors able to modify plant secondary metabolism involved in defense, resulting in improved plant adaptation to

Summary

changing environmental conditions, and resulting in improved nutritional value for food and pharmaceutical industry.

Capítulo 1. Introducción

El agrónomo alemán Hiltner fue el primero en definir la rizosfera, a finales del siglo XIX, como el efecto de las raíces de las leguminosas sobre el suelo circundante, en términos de una mayor actividad microbiana, debido a la liberación de compuestos orgánicos por las raíces (Lynch, 1990). Hasta finales del siglo XX la rizosfera no se consideró como un ecosistema sino como un efecto. Actualmente la rizosfera se considera un ecosistema constituido por tres componentes (planta, suelo y microorganismos) (Figura 1). Se trata de un ecosistema único, probablemente el mayor ecosistema del planeta, de funcionamiento complejo, definido por los tres componentes mencionados. Su conocimiento pasa no solo por comprender el funcionamiento de los tres componentes, sino también de las interacciones entre ellos.

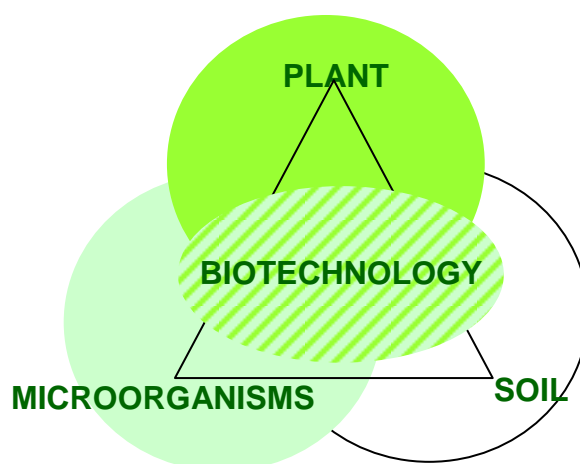


Figura 1. Biotecnología de la rizosfera. La rizosfera esta definida por la triple interacción de sus componentes: planta, suelo y microorganismos. Biotecnología de la rizosfera, es un término que hace referencia al manejo de cualquiera de los componentes bióticos y sus interacciones con el objeto de obtener un efecto beneficioso.

Actualmente se considera que el complejo sistema de comunidades microbianas asociadas a la planta es el segundo genoma de la planta, con un papel crucial sobre su fisiología, y de manera especial sobre su salud (Berendsen et al., 2012).

El desarrollo de procedimientos biotecnológicos en este sistema se ha producido como consecuencia de las potencialidades de aplicación que proporciona su conocimiento. En consecuencia, la investigación de la rizosfera se ha convertido en una de las áreas de trabajo mas intensas en biología. El estudio de la rizosfera esta ofreciendo enormes alternativas de aplicaciones con soporte biotecnológico y los resultados de estas aplicaciones están rindiendo extraordinarios resultados en el campo agrícola, alimentario, farmacéutico y ambiental.

El estudio de la rizosfera requiere un planteamiento multidisciplinar con metodologías multifásicas en prácticamente todas las áreas de conocimiento/investigación en biología. Desde el conocimiento mas básico, estudio de las interacciones desde una perspectiva biofísica y biogeoquímica, pasando por niveles moleculares, como el estudio de los sistemas de comunicación y adaptación metabólicos e interacciones multitróficas, a niveles fisiológicos complejos como el desarrollo de sistemas simbióticos (micorrizas y fijación del nitrógeno), promoción del crecimiento y salud vegetal.

Todos y cada uno de los enfoques mencionados en el estudio de la rizosfera, sin excepción, han conducido a considerables avances del conocimiento tanto desde un punto de vista básico como aplicado, y han hecho de la rizosfera un banco de información de enorme importancia.

El conocimiento de los procesos biofísicos y biogeoquímicos ha permitido identificar cambios de los elementos abióticos del sistema que fuera de el no se producirían, debido básicamente a la capacidad de los organismos que habitan la rizosfera para realizar procesos metabólicos impensables fuera de ella sin el aporte genético de la plantas y los microorganismos que habitan este sistema. Este es el caso de la movilización de nutrientes como el hierro y el fósforo, o las actividades metabólicas relacionadas con la inmovilización de metales pesados, o la biodegradación de contaminantes xenobióticos, como pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos y otros compuestos altamente estables y peligrosos desde el punto de vista de la salud humana. En consecuencia la rizosfera constituye un sistema especialmente adecuado para la obtención de microorganismos, en el caso de que sean cultivables, o de genes con una enorme aplicación biotecnológica orientada a la producción de antibióticos, sustancias bioactivas, movilización de nutrientes, biorremediación, o fitorremediación.

El estudio de los procesos de comunicación planta/microorganismos, ha progresado fundamentalmente en paralelo con el estudio de los sofisticados mecanismos de señalización que se producen en el proceso de formación y desarrollo de los sistemas simbióticos. La rizosfera es, muy probablemente, el espacio físico en el que se producen los intercambios de señales mas especializados entre microorganismos y plantas, podemos decir que el estudio de la comunicación planta/microorganismos comienza con el estudio de las interacciones simbióticas y a partir de ahí se amplía al estudio de la interacción planta/patógeno y al estudio de la interacción con bacterias beneficiosas, las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), así como a los sistemas de comunicación entre microorganismos para organizar su relación con otros seres vivos. A su vez el conocimiento de los sistemas de comunicación molecular conduce al conocimiento de las relaciones multitróficas que se establecen en la rizosfera, pudiendo escalar desde ahí al conocimiento de procesos situados en niveles de organización superiores, como procesos fisiológicos al nivel de la planta.

Gracias al reconocimiento de las señales de comunicación entre los organismos rizosféricos se han conseguido entender, al menos parcialmente, los mecanismos de acción de las denominadas PGPR. La interacción de las bacterias beneficiosas con las plantas pasó de ser simplemente un efecto en torno a la

década de los 90, a ser reconocido actualmente como un proceso con un alto nivel de complejidad en el que al menos dos genomas intercambian información sin llegar a compartir los mismos espacios desde un punto de vista celular. El grado de influencia entre los organismos participantes en la interacción es tan importante que el manejo biotecnológico de los organismos más accesibles, en función de la información que soportan, se ha constituido en una diana fundamental para mejorar las funciones del organismo más complejo que es la planta (Figura 2).

En consecuencia, sobre la base de los conocimientos actuales relativos a los mecanismos de la interacción que implican:

- Sistemas defensivos de la planta
- Metabolismo secundario de la planta implicado en sistemas defensivos
- Fisiología vegetal del crecimiento y desarrollo
- Sistemas de comunicación-elicitación
- Mecanismos de transducción de señales
- Metabolismo microbiano implicado en la comunicación intercelular fuera de la planta (fundamentalmente mecanismos de quórum sensing)
- Metabolismo primario y secundario microbiano implicado en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos entre otros.

Es posible aplicar procedimientos biotecnológicos basados en el conocimiento de la interacción planta/microorganismos que aportan un gran beneficio en áreas de un enorme interés en la actualidad:

- Tecnologías agroalimentarias, incluyendo la producción vegetal desde un punto de vista clásico, es decir valorando el rendimiento, y desde el punto de vista más moderno en el que se consideran aspectos como la sostenibilidad de la producción reduciendo el aporte de insumos, la salubridad de los productos y el impacto ambiental.
- Farmacéutico y nutracéutico, mejorando la calidad funcional de los productos alimentarios y productos con actividad farmacológica, mejorando la concentración de sustancias bioactivas.
- Fitorremediación, sistemas biológicos para la limpieza de residuos y recuperación de ecosistemas.

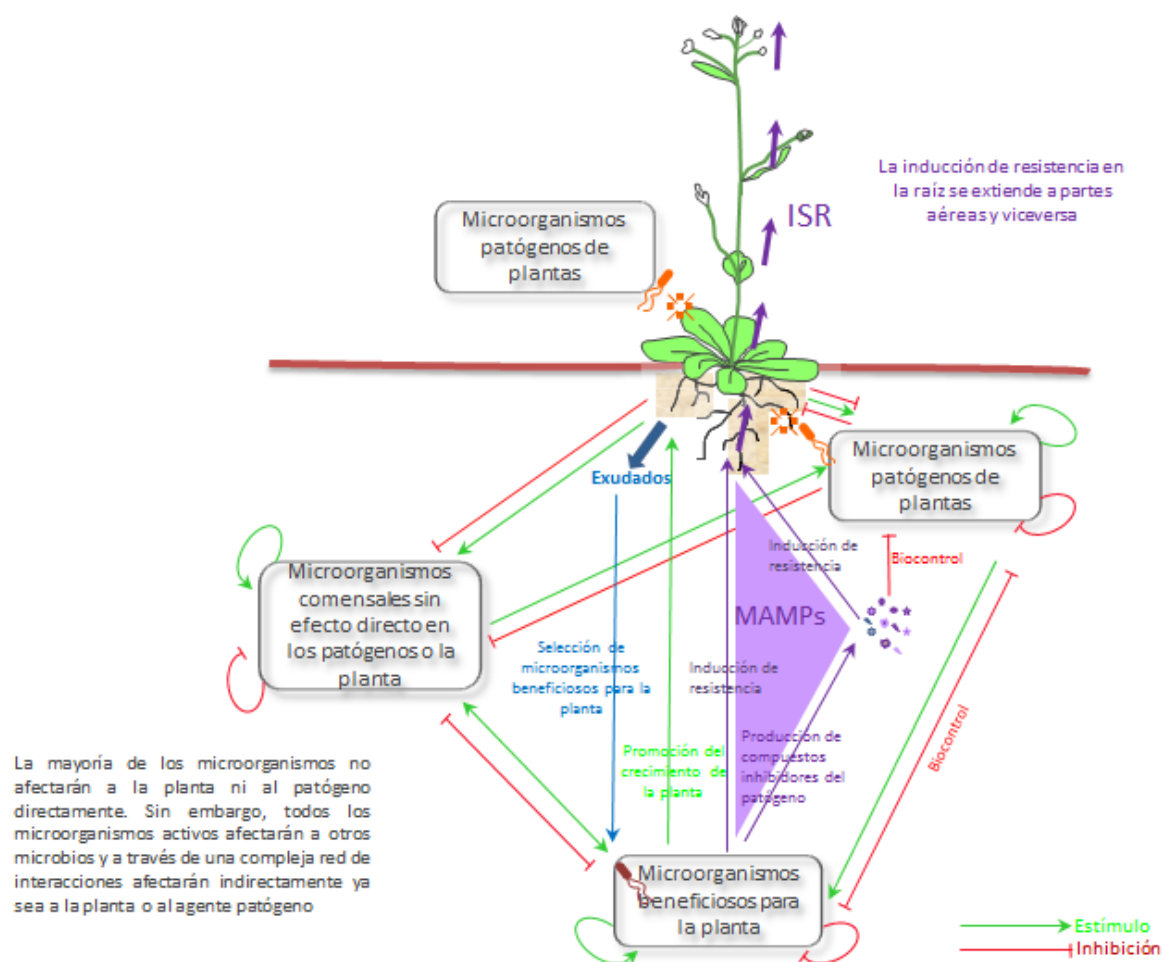


Figura 2. Modelo de las interacciones entre microorganismos beneficiosos, comensales y patógenos, entre ellos y con la planta. Efectos de los microorganismos sobre la planta. MAMPs Modelos moleculares asociados a microorganismos (microbe-associated molecular patterns). ISR Inducción de resistencia sistémica (Induced Systemic Resistance).

1.1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y elicitación de plantas con interés farmacéutico

Las bacterias edáficas beneficiosas de vida libre se denominan PGPR, de su acrónimo en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria (literalmente, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) (Kloepper et al., 1989), también denominadas por otros autores YIB, acrónimo del inglés Yield Increasing Bacteria (literalmente, bacterias que aumentan el rendimiento) (Tang, 1994). Dentro de las PGPR, encontramos bacterias pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Brown, 1974; Kloepper et al., 1988; Kloepper et al., 1989; Bashan y Levany, 1990; Okon y Labandera-González, 1994; Tang, 1994; Probanza et al., 1996; Arshad y Frankenberger, 1998; Barriuso et al., 2005; Hayat et al., 2010; Saharan y Nehra 2011).

Estas cepas ejercen su efecto de diferentes maneras, mejorando el estado de la planta, y se encuentran en la rizosfera. Podemos definir la rizosfera como la porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento, con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. Es una zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas, los microorganismos y el suelo (Lynch, 1990), en la que existe una elevada presión selectiva por parte de la planta. A través de los exudados, la planta selecciona los microorganismos que le resultan más beneficiosos para su salud (Marilley y Aragno, 1999; Lucas García et al., 2001; Barriuso et al., 2005; Berendsen et al., 2012).

La rizosfera de plantas salvajes es un buen sistema a partir del cual se pueden aislar PGPR debido a los procesos de co-evolución que han tenido lugar durante millones de años (Lucas García et al., 2001; Gutiérrez Mañero et al., 2003; Barriuso et al., 2005; Ramos Solano et al., 2008a). De la rizosfera se han aislado cepas capaces de modificar el metabolismo de la planta, proceso conocido como **elicitación**. La elicitación biológica se propone como una estrategia útil para mejorar, por un lado, la producción vegetal (biomasa) si la cepa utilizada induce promoción del crecimiento de la planta a la que se aplica y, por otro lado, por su potencialidad para alterar el metabolismo secundario de la misma, siendo esto último de especial interés para la industria farmacéutica y para la agricultura (van Loon y Glick, 2004; Zhao et al., 2005; Boué et al., 2009; Nosov, 2012; Perez-Alonso et al., 2012). Los factores de elicitación se pueden agrupar en dos bloques bien diferenciados: factores abióticos (intensidad luz, temperatura, entre otros) y factores bióticos (bacterias patógenas, bacterias beneficiosas, PGPR, hongos e insectos entre otros). Utilizaremos el término **elicitador** a lo largo del texto, refiriéndonos a un compuesto de origen microbiano que puede desencadenar una respuesta en plantas, pudiendo dar como resultado la acumulación de metabolitos secundarios, y ampliamos esta definición para incluir a los microorganismos beneficiosos.

El uso de PGPR dirigido a la modificación del metabolismo secundario podría ser muy adecuado por distintos aspectos. Mediante procesos biotecnológicos de elicitación, en los que se podrían implicar PGPR, puede obtenerse un notable aumento en la producción de bioactivos con el consecuente beneficio, si lo que se persigue es la obtención de materias primas con alto valor añadido para la fabricación de preparados galénicos o de productos alimentarios.

El uso de las bacterias rizosféricas o de alguno de sus componentes celulares y de los factores bióticos en general, para aumentar el contenido en bioactivos, se ha demostrado en diversos trabajos (Al-Tawaha et al., 2005; Lozovaya et al., 2004; Boué et al., 2008; Ramos Solano et al., 2010a, Chamam et al., 2013).

Además, diferentes estreses, como los causados por distintos factores ambientales, alteran la composición de los metabolitos secundarios debido a que las rutas metabólicas de síntesis de estos compuestos son altamente inducibles (Ebel y Cosio, 1994). El empleo de elicitores, entre ellos cepas PGPR,

podría solucionar esta problemática de falta de reproducibilidad existente en el contenido de bioactivos en los campos de cultivo debido a los cambios ambientales (Poulev et al., 2003).

Por todos estos motivos, la elicitación biológica con PGPR y con elicitores procedentes de PGPR, constituyen el procedimiento biotecnológico que se aplica en esta memoria. La relación entre el metabolismo defensivo, o metabolismo que suponga una ventaja adaptativa de la planta, y la concentración de compuestos bioactivos constituyen la hipótesis fundamental sobre la que se apoya esta metodología (Figura 3).

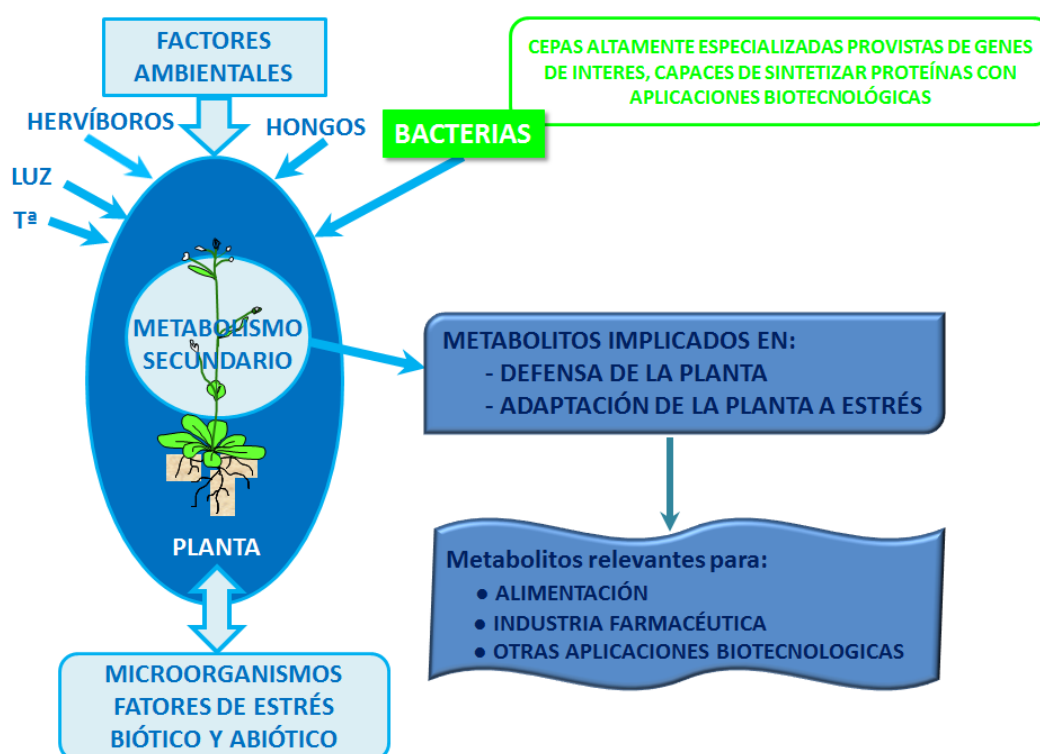


Figura 3. Biotecnología de la rizosfera. Bacterias seleccionadas por las plantas procedentes de su microbioma rizosférico se aplican para estimular el metabolismo defensivo de la planta en el que están implicados metabolitos de interés farmacéutico y alimentario.

La soja y el hipérico son los materiales de trabajo elegidos para este estudio por su importante papel en el ámbito farmacológico desde la perspectiva de la producción en planta. En el caso de la soja, se trata de una materia prima de enorme importancia en el desarrollo de alimentos funcionales, con un considerable efecto sobre la salud. Esto explica el gran interés por parte de los investigadores en la búsqueda de metodologías eficaces de inducción de estos metabolitos secundarios en las plantas de soja. Con respecto al Hipérico, se trata de una materia prima fuente de metabolitos relevantes por su efecto, antibacteriano,

antiretroviral y antidepresivo, que ha servido de fuente de información, a través de sus mecanismos de acción, para el desarrollo de fármacos muy relevantes.

1.1.1. Mecanismos de acción de las PGPR

Los mecanismos por los que las PGPR ejercen sus efectos se pueden dividir en dos: directos o indirectos (Ramos Solano et al., 2008a), dependiendo de la implicación de la planta, según se describe a continuación.

Mecanismos indirectos

En los mecanismos de acción indirectos la estimulación del crecimiento no requiere la participación de la planta, la bacteria libera algún metabolito, que a su vez, afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1993; van Loon, 2007; Martínez-Viveros et al., 2010). Podemos diferenciar distintos tipos de mecanismos indirectos:

- Producción de sustancias movilizadoras de nutrientes, como ácidos orgánicos o aminoácidos (Jones et al., 1994; Jones, 1998; Vassilev et al., 2006; Rodríguez et al., 2006; Ramos Solano et al., 2009).
- Producción de sideróforos. Los sideróforos secretados por las PGPR quelan la mayor parte del Fe^{3+} presente en el suelo permitiendo a las PGPR competir satisfactoriamente contra patógenos y mejorar su nutrición férrica (Kloepper et al., 1980; Leong, 1986; Weller, 1988; Ramos Solano et al., 2010b).
- Control de patógenos edáficos por antagonismos o competencias, mediante la síntesis de moléculas antifúngicas y antibióticos. (Burr y Caesar, 1984; Schroth et al., 1984; Gaskins et al., 1985; Davison, 1988; Chin-A-Woeng et al., 2000; Beneduzi et al., 2012).
- Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos (Toyoda y Utsumi, 1991; Lugtenberg y Kamilova, 2009).
- Síntesis de enzimas hidrolíticas de pared fúngica (Lim et al., 1991; Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Ramos Solano et al., 2010b).
- Competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Kloepper et al., 1988; O'Sullivan y O'Gara, 1992; Devliegher et al., 1995; Kamilova et al., 2005, Lugtenberg y Kamilova, 2009).
- Síntesis de ácido cianhídrico. Habitualmente producido por bacterias del género *Pseudomonas*, lo que apunta hacia un posible efecto antipatogénico (Voisard et al., 1989; Hayat et al., 2010).
- Mejora del establecimiento de la simbiosis con rizobios o con micorrizas (mycorrhization helper bacteria, MHBs) (Garbaye, 1994; Merk-Kozackuk y Skorupska, 2001; Lucas García et al., 2004; Barriuso et al., 2008a; Estévez et al., 2009).

También se incluyen en este grupo los microorganismos capaces de mineralizar de forma eficaz la materia orgánica poniendo a disposición de la planta nutrientes y los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Mecanismos directos

Son aquellos en los que el microorganismo produce un metabolito que por sí mismo es capaz de modificar la fisiología de la planta y por tanto, requiere su mediación (Kloepper, 1993; Arshad y Frankenberger, 1998; Ramos Solano et al., 2008a). De forma resumida, los mecanismos de acción directa se muestran en la Tabla 1.

Dentro del grupo de mecanismos directos, es de especial relevancia la capacidad de inducción de Resistencia Sistémica en la planta con un gran potencial de aplicación y de especial importancia en este trabajo por su estrecha relación con el metabolismo secundario defensivo.

Tabla 1. Mecanismos de acción directa.

<i>Mecanismo</i>	<i>Efecto</i>	<i>Referencias</i>
Fijación de nitrógeno simbiótica asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno	Baldani y Dobereiner, 1980 Dobbelaere et al., 2003 Hayat et al., 2010
Producción de reguladores de crecimiento	Biomasa (parte aérea y radical), ramificación de raíces y floración	Gutiérrez Mañero et al., 1996 y 2001 Patten y Glick, 2002 Dey et al., 2004 Spaepen et al., 2008 Kang, et al., 2012
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical	Glick et al., 1994 y 2007
Asociación simbiótica con hongos micorrizógenos	Biomasa y contenido en fósforo	Toro et al., 1998 Barriuso, et al., 2008a
Inducción de Resistencia Sistémica	Disminución de síntomas frente a patologías	van Loon et al., 1998 van Wees et al., 2008 Beneduzi, et al., 2012 Erbs y Newman, 2011

1.1.2. Inducción de Resistencia Sistémica

Debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado un complejo metabolismo secundario dirigido a hacer frente a las variaciones externas, entre ellas, los ataques de distintos patógenos. La defensa

frente a predadores como herbívoros, desencadena una respuesta metabólica que conduce a la síntesis de sustancias poco digestivas o repelentes como los taninos e, incluso, a la síntesis de compuestos volátiles que alertan a otros individuos cercanos del peligro inminente. El ataque de agentes patógenos, virus, hongos o bacterias, activa la biosíntesis de sustancias defensivas dirigidas a frenar el ataque del patógeno. Se producen respuestas encaminadas a bloquear físicamente la infección, o a inhibir el crecimiento del microorganismo (Boller, 1995). Estas respuestas van acompañadas de la liberación de especies reactivas de oxígeno, estas aparte de su efecto antibacteriano, también pueden reforzar la pared celular y actuar como elementos de transducción de señal y estrés para inducir otras respuestas de defensa (Apel y Hirt 2004), activación de quinasas MAPK y cambios en la fosforilación de otras proteínas (Peck et al., 2001). Al cabo de unos minutos se activa la biosíntesis de etileno (Spanu et al., 1994), la endocitosis de receptores (Boller y Felix, 2009) y la activación génica (Zipfel et al., 2004). Finalmente al cabo de horas se produce la deposición de callosa (Gómez-Gómez et al., 1999), entre otros eventos. La expresión de genes de defensa que precede a la percepción del patógeno también incluye la producción de compuestos fenólicos, algunos con características antimicrobianas como las fitoalexinas (Thomma et al., 1999). En otras ocasiones el patógeno puede no causar daños en la planta pero la dota de una capacidad defensiva previa a la llegada del patógeno. Este último mecanismo de protección consiste la inducción de un estado fisiológico único denominado **priming** (Conrath et al., 2002). El estado de *priming* también puede ser inducido mediante el tratamiento de la planta con diversos compuestos tanto naturales como sintéticos. Las plantas en este estado, son capaces de desarrollar una activación más rápida, más fuerte o ambas cosas a la vez, de las respuestas defensivas tras el ataque de patógenos, insectos o en respuesta a factores de estrés abióticos (Conrath et al., 2006). Las plantas que están en este estado fisiológico pueden presentar un menor crecimiento que las no estimuladas, lo que se debe al desvío de recursos energéticos hacia el metabolismo secundario en detrimento de la generación de nuevas estructuras (van Hulten et al., 2006).

En los últimos años ha habido un creciente interés por conocer cuáles son los mecanismos que desencadenan la producción de éstos compuestos defensivos. Hasta ahora hay descritas dos vías de transducción fundamentales, la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, del inglés, Systemic Acquired Resistance) (Lawton et al., 1995; Ryals et al., 1996) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR, del inglés, Induced Systemic Resistance) (van Loon et al., 1998). Ambas respuestas, la SAR y la ISR, comienzan cuando determinadas moléculas, denominadas **elicitores**, entran en contacto con la planta. Los **elicitores bióticos** pueden ser de distinta naturaleza, entre ellos podemos citar: proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos o compuestos volátiles. Pueden ser moléculas sintetizadas por el microorganismo, o bien constituyentes de la pared del mismo, sean microorganismos patógenos o no patógenos. Las dos respuestas, como se señala mas adelante, se diferencian claramente por las vías de transducción de señales que utilizan, además de que la respuesta ISR es efectiva frente a patógenos necrotróficos, mientras que la respuesta SAR es efectiva frente a patógenos biotróficos (Ton et al., 2002; Doornbos et al., 2012).

La inducción sistémica del metabolismo secundario implicado en defensa se ha constatado en numerosas especies vegetales (van Loon, 2007), lo que no está tan claro es que elicitores, son los responsables de desencadenar este efecto. Parece ser que los lipopolisacáridos (LPS) de las paredes bacterianas y la proteína flagelina constituyente del flagelo se encuentran entre los elicitores más frecuentes capaces de desencadenar la respuesta defensiva (Lemanceau y Alabouvette, 1993; Yamaguchi et al., 2000; Al-Tawaha et al., 2005; Ramos Solano et al., 2008b; van Wees et al., 2008), puesto que ambos componentes aislados de microorganismos beneficiosos son capaces de inducir resistencia sistémica en diversas especies vegetales, tales como *Arabidopsis*, tomate y judía (Bakker et al., 2007). Esto sugiere que existe una especificidad en el reconocimiento de estos elicitores y que las plantas poseen una serie de receptores capaces de reconocerlos para así poder activar los mecanismos de defensa. Los elicitores son generalmente componentes conservados de la superficie celular o bien, metabolitos liberados por el microorganismo (sideróforos, antibióticos, biosurfactantes, etc.), pudiendo estar presentes varios elicitores desencadenantes de la resistencia sistémica en un mismo microorganismo (Bakker et al., 2007). Actualmente a estos elicitores se les denomina PAMPs si provienen de un patógeno (del inglés, pathogen-associated molecular patterns) o bien, en general, MAMPs (del inglés, microbe-associated molecular patterns) (Mackey y McFall, 2006; Göhre y Robatzek, 2008; Boller y Felix, 2009; Millet et al., 2010; van Hulten et al., 2010; Erbs y Newman, 2011; Lakshmanan et al., 2012).

La **Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)** consiste en la capacidad de las plantas para adquirir resistencia tras el ataque de un patógeno que sólo causa daños o necrosis localizadas (Ryals et al., 1996). Está inducida por bacterias y hongos patógenos, por ejemplo, algunas cepas patógenas del género *Pseudomonas* son capaces de activar mecanismos de resistencia por parte de la planta, que se defiende en respuesta a la invasión microbiana, incrementando la velocidad y los niveles de síntesis de compuestos antimicrobianos, llamados fitoalexinas, implicados en la defensa de la planta (Lemanceau y Alabouvette, 1993; Kishi-Kaboshi et al., 2010; Hamada et al., 2012). Si la planta sobrevive, adquiere resistencia a un amplio espectro de patógenos en zonas distantes de la planta que no fueron infectadas previamente. En *Arabidopsis thaliana*, estos procesos están mediados por ácido salicílico (SA, del inglés, salicylic acid), produciéndose incrementos locales en los niveles endógenos de esta hormona, la participación del regulador transcripcional NPR1 y, como consecuencia, la activación coordinada de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, del inglés, pathogenesis-related proteins) (Uknes et al., 1993; Lawton et al., 1995; Durrant y Dong, 2004; van Loon et al., 2006).

El SA y el factor de regulación NPR1 son necesarios como intermediarios en la cascada de transducción de señal en la respuesta SAR. Este hecho se ha demostrado con diversos mutantes y transgénicos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* como los NahG, que expresan la enzima bacteriana SA-Hidroxilasa y no son capaces de acumular SA, u otros mutantes como los *Sid*, que también tienen bloqueada la ruta SAR (Lawton et al., 1995) o los mutantes *npr1* (Cao et al., 1994).

Algunas bacterias no patógenas son capaces de desencadenar en la planta las mismas respuestas que una bacteria patógena pero sin la sintomatología asociada. De este modo, incrementan los niveles de ciertos metabolitos relacionados con los mecanismos defensivos de las plantas y, en general, afectan al metabolismo secundario. Este fenómeno se denomina **Resistencia Sistémica Inducida (ISR)** y confiere una resistencia a las plantas que se manifiesta cuando éstas se enfrentan a un patógeno. La resistencia sistémica inducida por bacterias rizosféricas fue descrita por primera vez por van Peer et al., (1991) en clavel frente a *Fusarium oxysporum* y por Wei et al., (1991) en pepino frente a *Colletotrichum orbiculare*. En ambos casos, las rizobacterias se mantuvieron confinadas en las raíces y los patógenos fueron inoculados y colonizaron sólo la parte aérea de las plantas, de manera que no hubo contacto directo entre las rizobacterias y los patógenos. Por lo tanto, el control de la enfermedad es un fenómeno mediado por la planta. En las últimas décadas, se ha demostrado la inducción de resistencia sistémica mediada por rizobacterias en diversas especies vegetales como judía, rábano, tabaco, tomate, así como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, siendo eficaces contra hongos, bacterias y virus patógenos (Maurhofer et al., 1994; Alström, 1995; Leeman et al., 1995; Pieterse et al., 1996; Duijff et al., 1998; Barriuso et al., 2008b; Ramos Solano et al., 2008b; Ramos Solano et al., 2010b).

Las señales moleculares que participan en ISR fueron investigadas por primera vez por Pieterse et al. (1996 y 1998). Estos autores describieron, utilizando mutantes, que la ISR está mediada por ácido jasmónico (JA, del inglés, jasmonic acid) y etileno (ET) en *Arabidopsis thaliana*, siendo la cepa inductora de la resistencia *Pseudomonas fluorescens* WSC417r y el agente patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000. También demostraron que el factor de regulación NPR1 juega un papel crucial en la ruta de transducción de señales y que las proteínas PR no están implicadas, aunque la planta presente un sistema de defensa reforzado que se pone de manifiesto frente al ataque de un patógeno (van Loon et al., 1998) (Figura 4).

El modelo propuesto por Pieterse et al. (1996 y 1998) y van Loon et al. (1998) es ahora mucho más complejo, tras haberse demostrado que otras cepas PGPR son capaces también de inducir defensas dependientes de SA, rutas de defensa dependientes tanto de SA como de ET/JA al mismo tiempo y rutas independientes de ambos (van Hulten et al., 2006; Ramos Solano et al., 2008b; van Wees et al., 2008). Esto demuestra que la inducción de respuesta sistémica depende de los tres elementos (planta-PGPR-patógeno) y que al variar cualquiera de los tres factores podrán variar las respuestas y alteraciones metabólicas.

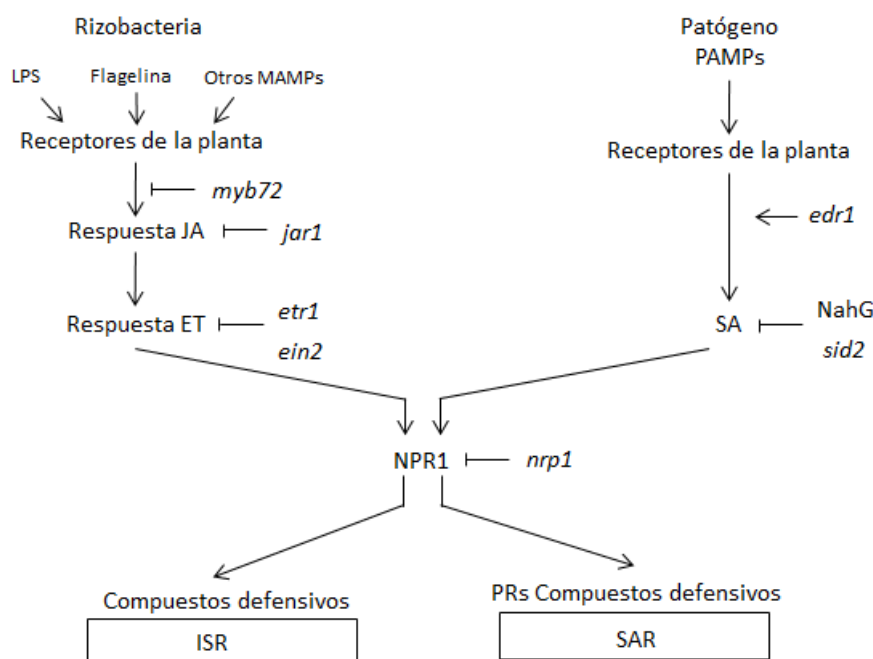


Figura 4. Vías de transducción de señales que llevan a la SAR inducida por patógenos y a la ISR inducida por rizobacterias en *Arabidopsis thaliana* (Pieterse et al., 1998; Ton et al., 2006). PAMPs modelo molecular asociado a patógenos, LPS lipopolisacáridos, MAMPs modelo molecular asociado a microorganismos, JA ácido jasmónico, ET etileno, SA ácido salicílico, PRs proteínas relacionadas con la patogénesis. Flechas sólidas indican estimulación, flechas discontinuas indican priming para estimulación, barras en T indican represión.

Sabemos que algunas rutas metabólicas están especialmente relacionadas con la síntesis de compuestos de defensa, como la ruta del ácido shikímico para la síntesis de flavonoides. La activación de esta ruta al enfrentar a la planta con el patógeno puede detectarse mediante aumentos en la actividad de enzimas clave de la ruta, como la fenilalanina amonio-licasa (PAL, del inglés, Phenylalanine ammonia-lyase). Estudios recientes han demostrado que la resistencia sistémica que algunas cepas PGPR son capaces de inducir en *A. thaliana* frente a *Pseudomonas syringae* DC3000 se acompaña de un aumento de la actividad PAL (Ramos Solano et al., 2008b). De esta forma, el empleo de cepas PGPR no es sólo de interés por su potencial para aumentar la resistencia frente a patógenos, sino por su capacidad para inducir rutas metabólicas implicadas en la síntesis de compuestos defensivos con un valor añadido por tener aplicación farmacéutica o en la industria alimentaria (Serrano et al., 2012; Chamam et al., 2013).

Por otro lado, del mismo modo que pueden emplearse determinadas cepas PGPR para inducir o elicitar determinadas rutas metabólicas, se utilizan directamente elicitors aislados de estas cepas. Existen multitud de trabajos que demuestran cómo elicitors de distinta naturaleza son capaces de desencadenar las respuestas defensivas de la planta y llevan a la producción de metabolitos secundarios (Zhao et al., 2005; Park et al., 2008).

Si la finalidad de la elicitación es el aumento de los metabolitos secundarios, el cultivo *in vitro* confiere ciertas ventajas importantes frente al uso de la planta (Karuppusamy, 2009; Patil et al., 2013).

1.2. Inducción del metabolismo secundario: Elicitación

Tradicionalmente, se habla de inducción del metabolismo secundario defensivo de las plantas por las implicaciones que tiene en la etapa de producción agrícola, por su repercusión en la disminución del aporte de pesticidas y otros productos químicos como pueden ser los abonos. Es decir, que el objetivo de la inducción del metabolismo secundario suele ser el incremento de la producción primaria con fines alimentarios. Sin embargo, existe otro objetivo con un fuerte contenido biotecnológico que es la inducción del metabolismo secundario, con el objeto de conseguir no una mejor cosecha relativa a la cantidad de biomasa que proporciona la planta, sino una mayor concentración de moléculas con actividad farmacológica.

Como ya se ha comentado, las rutas de síntesis de metabolitos secundarios son altamente inducibles (Ebel y Cosio, 1994) lo que representa un reto en cuanto a la identificación y manejo de los compuestos o agentes biológicos responsables de la inducción, además no solo es importante conseguir la inducción sino también, que el efecto sea reproducible y por lo tanto estandarizable (Poulev et al., 2003). La mayoría de los estudios de elicitación realizados se han llevado a cabo en cultivo *in vitro*, donde las condiciones son más controlables. Sin embargo y lejos de excluir el uso de microorganismos beneficiosos como agentes inductores del metabolismo secundario en campo, la elicitación de plantas con bacterias beneficiosas aparece como un campo novedoso. Como ya se ha comentado anteriormente el término elicitor se ha transformado en el término PAMPs si provienen de un patógeno (del inglés, pathogen-associated molecular patterns) o bien, en general, MAMPs (del inglés, microbe-associated molecular patterns), sin embargo en esta memoria seguiremos utilizando el término **elicitor** a lo largo del texto, refiriéndonos a un compuesto de distinta naturaleza y origen que puede desencadenar una respuesta en plantas, dando como resultado la acumulación de metabolitos secundarios, se puede ampliar esta definición para incluir a los microorganismos beneficiosos. Por lo tanto, definiremos elicitor como un compuesto químico, una mezcla compleja o aquellos microorganismos capaces de desencadenar una respuesta en los organismos vivos de origen vegetal.

Los elicitores son herramientas útiles para mejorar la producción de compuestos vegetales de interés (Zhao et al., 2001; Yu et al., 2002; Eswaranandam, 2012; Serrano et al., 2012; Chamam et al., 2013). De esta forma, podemos definir la **elicitación** como un proceso de inducción o potenciación de la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad (Namdeo, 2007).

Se han identificado multitud de compuestos o estímulos que potencian la producción de metabolitos secundarios de interés. En general, los elicitores pueden clasificarse en base a su “naturaleza” como elicitores bióticos o abióticos. Los elicitores bióticos son sustancias de origen biológico, de distinta

naturaleza química, entre los que se han encontrado polisacáridos derivados de la pared celular vegetal (pectina o celulosa) y de microorganismos (quitina o glucanos), o incluso hormonas vegetales como el ácido salicílico (SA) o el metiljasmonato (MeJA) (Namdeo, 2007). Por otro lado, los elicitores abióticos no tienen un origen biológico y se agrupan en factores físicos y compuestos químicos (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los elicitores (modificado de Vasconsuelo y Boland, 2007 y Radman et al., 2003).

Bióticos	
Composición definida	Composición compleja
- Alginato (Aoyagi et al., 2006)	- Extracto de levadura (Pitta-Alvarez et al., 2000; Broeckling et al., 2005; Sánchez-Sampedro et al., 2005)
- Pectina (Flores-Sánchez et al., 2002)	- Homogenado fúngico (Soylu et al., 2002)
- Quitosan (Vasconsuelo et al., 2004; Sánchez-Sampedro et al., 2005)	- Esporas fúngicas (Zook, 1998)
- Quitina (Hadwiger, 1999; Zhang et al., 2002; Sánchez-Sampedro et al., 2005)	- Patógenos del género <i>Penillium</i> , <i>Botrytis</i> y <i>Colletotrichum</i> (Referencias en revisión de Terry y Joyce, 2004)
- Elicitinas (Bonnet et al., 1996)	- Elicitores metabólicos (bioefectores) (Algar et al., 2012)
- Lipopolisacáridos (Ramos Solano et al., 2008b)	
- Exopolisacáridos (Park et al., 2008)	
- Ácido salicílico (Kneer et al., 1999)	
- Metil jasmonato (Naoumkina et al., 2007)	
-Flagelina (van Wees et al., 2008)	
-Lipopeptidos de gram positivas (Jourdan et al., 2009)	
-Lipopolisacaridos y Peptidoglicanos (Erbs y Newman, 2011)	
Abióticos	
Compuestos químicos	Factores físicos
- Ortovanadato de sodio (Hattori y Ohta, 1985)	- Estrés térmico (Soylu et al., 2002)
- Sulfato de vanadio (Bhagwath y Hjortso, 2000)	- Estrés osmótico (Farber et al., 2003)
- Sales de metales pesados (Pitta-Alvarez et al., 2000)	- Radiación UV (Soylu et al., 2002; Broeckling et al., 2005)
-Etil acetato, metil jasmonato (Eswaranandam et al., 2012)	- Lesión (Valueva et al., 2001)
-Reguladores de crecimiento vegetal (Referencias en revisión de Terry y Joyce, 2004.)	-Calor, frío, salinidad, ozono, sequedad, luz, heridas (Referencias en revisión de Terry, and Joyce, 2004 y referencias en revisión de Capanoglu, 2010)

1.2.1. Mecanismos de elicitación y factores que influyen en la elicitación

Los mecanismos de elicitación del metabolismo secundario son muy diversos, puesto que, los elicitores pueden modular la ratio de biosíntesis, acumulación y/o tránsito en la vacuola, la tasa de renovación y de degradación (Barz et al., 1990). Se sabe que los niveles de fitoalexinas pueden regularse por diferentes elicitores a través de uno o más de estos mecanismos (Soylu et al., 2002), y que están implicados

sistemas de respuesta mediados por cascadas de MAPK en relación con sistemas de control de la expresión génica mediados por factores de transcripción (Kishi-Kaboshi et al., 2010) y por segundos mensajeros como el Ca^{++} (Hamada et al., 2012).

La efectividad de la elicitación como herramienta para potenciar la producción de metabolitos secundarios depende de una compleja interacción entre el elicitor y la célula vegetal. Los principales factores que pueden afectar esa interacción y en consecuencia la respuesta a la elicitación son (Namdeo, 2007; Van Wees et al., 2008; Conrath, 2011; Erbs y Newman, 2011):

A) Especificidad del elicitor. Existen evidencias de que el mismo elicitor puede estimular el metabolismo secundario de diferentes especies vegetales y, por otro lado, que una misma especie puede ser sensible a diversos elicitores.

B) Concentración del elicitor. La concentración del elicitor es un factor que afecta en gran medida la intensidad de la respuesta. La dosis efectiva, la cual varía según las especies vegetales, sólo puede determinarse empíricamente. Se ha demostrado que los niveles del elicitor, que ejercen efectos estimuladores en ciertos sistemas vegetales, cuando se aplican a otro sistema carecen de actividad, lo cual refleja una distinta sensibilidad de los componentes moleculares implicados en la elicitación.

C) Duración de la exposición al elicitor. Respecto al intervalo del tratamiento, hay pocos datos disponibles. En general, el elicitor está en contacto con el sistema hasta su recolección, pero el tiempo requerido para obtener una acumulación máxima del metabolito secundario es característico de cada especie vegetal y normalmente se precede de un incremento en la actividad de los enzimas implicados.

D) Fase de crecimiento, composición del medio, luz. En cultivos celulares, por lo general, el momento más adecuado para añadir el elicitor es durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la maquinaria enzimática está en el estado de máxima operatividad y la respuesta al elicitor se conseguirá, en consecuencia, de forma más eficiente. Otro factor a tener en cuenta es la presencia de reguladores de crecimiento en el medio, que pueden afectar en gran medida la elicitación del metabolismo secundario.

Teniendo en cuenta la variabilidad de las respuestas de elicitación debido a diferentes factores como los descritos anteriormente, la optimización de la composición del medio y las condiciones de cultivo también representan un aspecto importante en los protocolos de elicitación.

1.2.2. Aplicación de la tecnología de elicitación para la producción de metabolitos con interés farmacológico

El descubrimiento de las bases moleculares del efecto terapéutico de las plantas, junto con el enorme desarrollo de la Química ha permitido el descubrimiento de nuevas moléculas, la investigación de las

bases moleculares de su efecto farmacológico, su elucidación estructural y la síntesis en el laboratorio. Actualmente las plantas sirven como materia prima para la obtención de fármacos desde varias perspectivas:

A partir de moléculas de origen vegetal, por ejemplo, la efedrina, procedente de *Ephedra (Ephedra distachya)*, que encaja en los receptores adrenérgicos de mamíferos, se diseñó el primer B-bloqueante (propanolol) uno de los medicamentos de más uso en el tratamiento de la hipertensión arterial. Es decir, la molécula de origen vegetal sirve como molde para el desarrollo de nuevas moléculas basándose en su efecto agonista, o antagonista. Otra alternativa es la modificación parcial en el laboratorio para obtener la molécula que finalmente será el principio activo del medicamento. Por ejemplo, la baccatina III obtenida de las hojas y de cultivos celulares del tejo americano sirve de base para obtener el paclitaxel por modificación sintética. Esta molécula es el principio activo del taxol®, quimioterápico de primera línea en el tratamiento del cáncer de ovario y adyuvante en el de mama y pulmón. Por último la molécula obtenida de la planta es directamente el principio activo del medicamento, como por ejemplo, la morfina.

Muchos de los productos derivados de plantas han permitido el descubrimiento de receptores, dianas terapéuticas y bases fisiológicas de procesos como la transmisión del dolor, en el caso de la morfina, el funcionamiento y excitabilidad del músculo cardíaco, en el caso de los digitálicos, determinados aspectos del ciclo celular, en el caso de los antitumorales, y un largo etc, porque prácticamente el estudio de cada droga de origen natural ha permitido dilucidar algún proceso fisiológico, celular o molecular.

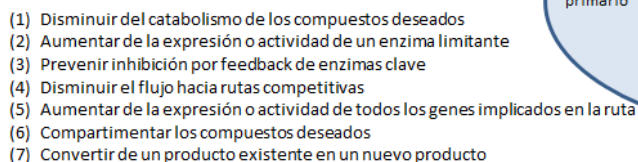
La extracción de metabolitos secundarios de las plantas sigue teniendo una importancia considerable, no solo desde la perspectiva de la producción y diseño de nuevos medicamentos, sino también en la producción de productos para la industria alimentaria, como aceites esenciales, colorantes, antioxidantes y estabilizantes naturales como el licopeno. Un alto número de estos metabolitos son difíciles o casi imposibles de sintetizar de forma rentable. Además, en muchos casos el producto natural es aceptado más fácilmente por los consumidores que uno artificial. Por otra parte, es muy difícil reproducir la composición de un extracto natural y por ello, la extracción natural se utiliza para la obtención de un gran número de aromas o perfumes que son el resultado de una mezcla de cientos de compuestos diferentes, como en el caso del jazmín y la fresa, o para compuestos que tienen estructuras moleculares complejas (por ejemplo, algunos alcaloides y glucósidos). Por otro lado, los metabolitos secundarios se producen a niveles basales bajos (menos del 1% del peso seco) y dependen en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Dixon, 2001; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

La biotecnología, especialmente el cultivo de tejidos vegetales, juega un papel vital en la búsqueda de alternativas para la producción de compuestos medicinales de interés a partir de las plantas (Rao y Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). A escala mundial, las plantas medicinales se usan principalmente como drogas y extractos crudos. Varias de las sustancias activas más potentes se emplean como compuestos aislados, incluyendo muchos alcaloides como la morfina (analgésico), codeína (antitusivo), papaverina (vasodilatador), efedrina (estimulante), ajmalina (antiarrítmico), quinina (antimalárico), reserpina

(antihipertensivo), galantamina (inhibidor de acetilcolinesterasa), escopolamina (mareos), berberina (psoriasis), cafeína (estimulante), capsaicina (reumatismo), colchicina (gota), yohimbina (afrodisíaco), pilocarpina (glaucoma) y varios tipos de glucósidos cardíacos (insuficiencia cardíaca) (Wink et al., 2005; Karuppusamy, 2009).

El uso de los cultivos celulares, de tejidos y órganos vegetales para producir y acumular los mismos compuestos químicos que la planta de origen en la naturaleza está reconocida casi desde el inicio de los ensayos de la tecnología *in vitro*. El potencial del cultivo de células, tejidos u órganos vegetales en biorreactores, de manera similar a los procesos de fermentación con microorganismos, para la producción de metabolitos secundarios o productos naturales fue demostrado por Zenk y sus colaboradores en 1977 lograron establecer cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* capaces de producir serpentina y ajmalicina, dos alcaloides derivados del indol característicos de esta planta (Zenk et al., 1977). Actualmente la lista de compuestos producidos mediante cultivo *in vitro* asciende a más de 100, es muy completa la revisión realizada por Oksman-Caldentey and Inzé (2004). La obtención de productos químicos definidos en cultivos *in vitro*, cuidadosamente regulados, proporciona además una excelente herramienta para investigar en profundidad las rutas bioquímicas y metabólicas en un microambiente altamente controlado.

En la figura 5, modificada de Oksman-Caldentey e Inzé (2004), se puede apreciar el potencial de la aplicación del cultivo *in vitro* en la producción de metabolitos secundarios, y las distintas vertientes objeto de investigación que se pueden abordar no solo para mejorar la producción sino también para avanzar en la comprensión de los mecanismos de regulación y en las bases moleculares de su producción.



- El cultivo de células vegetales elimina posibles fronteras políticas o barreras geográficas frente a la producción en campo como, por ejemplo, la restricción de la producción natural de caucho a los trópicos o del pigmento antocianina a climas con alta intensidad de luz, evitando también la extinción de especies.
- Las técnicas del cultivo de tejidos ofrecen la oportunidad de confeccionar el perfil químico de un producto fitoquímico, mediante la manipulación del microambiente químico o físico y, así, producir un compuesto con mayor potencial para el uso humano.

A pesar de todas las ventajas del empleo del cultivo *in vitro* para la obtención de metabolitos secundarios de interés, después de más de 25 años de investigación, sólo se han podido establecer cuatro procesos a nivel comercial: Shikonina, de *Lithospermum erythrorhizon* por la compañía Mitsui Petrochemical Ind. Ltd¹³, Ginsenosido de *Panax ginseng* y Purpurin de *Rubia akane* por Nitto Denko Corp¹⁰, y Taxol de *Taxus cuspidata* por Phyton Biotech, Inc en asociación con Bristol-Myers Squibb Co. Esto es debido principalmente a la baja velocidad de crecimiento de estos cultivos (en comparación con los de microorganismos), baja productividad volumétrica, bajos rendimientos del producto, altos costes del proceso, inestabilidad del producto en los cultivos y, principalmente, desconocimiento del metabolismo secundario a nivel de intermediarios metabólicos, sus enzimas y su regulación. En otros casos, la producción requiere mayor diferenciación y por tanto el empleo de cultivos de microplantas o de órganos (Dörnenburg y Knorr, 1997).

El reconocimiento de estos problemas desde finales de la década de los ochenta favoreció que las investigaciones sobre la producción de metabolitos secundarios se dirigieran hacia la aplicación de diversas estrategias para incrementar la productividad de estos compuestos *in vitro*. Dichas estrategias se apoyan en la genética y la biología molecular en combinación con la bioquímica y fisiología vegetal, para estudiar el metabolismo secundario y su regulación. El avance en el conocimiento de esta tecnología ha culminado en la aparición de la ingeniería metabólica y la agricultura molecular (*molecular farming*). En el área del cultivo *in vitro* se han planteado diversas hipótesis y procedimientos biotecnológicos para potenciar la producción de metabolitos secundarios de plantas medicinales. Algunas de estas incluyen el *screening* de líneas celulares de alto rendimiento, modificación del medio, suplemento de precursores, elicitación, cultivo a gran escala en biorreactores, cultivos de raíces transformadas ("*hairy root*"), inmovilización de las células vegetales, biotransformación y otros (Dörnenburg y Knorr, 1995; Vanisree et al., 2004).

Por todas las razones expuestas, el estudio de los sistemas de elicitación basados en modelos moleculares asociados a determinantes bióticos o abióticos, físicos o químicos, en planta entera, sigue constituyendo un paso fundamental para el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la producción, estimulación y acumulación de metabolitos con interés medicinal. Actualmente las técnicas

basadas en elicitación constituyen una herramienta fundamental para el descubrimiento y optimización de metabolitos secundarios, y a su vez un paso previo fundamental para su posterior aplicación *in vitro*, con todas las ventajas anteriormente indicadas (Namdeo, 2007). El conocimiento de las condiciones de crecimiento naturales de una determinada especie nos pueden proporcionar una valiosísima información sobre los potenciales agentes o condiciones que disparan una ruta metabólica y, por lo tanto, a identificar el elicitor para posteriormente aplicarlo en el cultivo *in vitro*.

1.3. Plan de trabajo y objetivos general

La aplicación de elicitores abre una nueva ventana hacia la diversidad fitoquímica, la mejora de cualidades nutricionales de alimentos funcionales de forma natural, y al conocimiento de las rutas biosintéticas de estos productos y su regulación.

La investigación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) integra tanto la aproximación a la producción vegetal con fines alimentarios como la producción vegetal orientada a fines farmacéuticos, es decir, por una parte incrementar la producción de cultivos en zonas de baja producción, y por otra, su aplicación como elicitores bióticos capaces de alterar no solo la producción de biomasa, sino también de alterar los niveles de productos del metabolismo secundario implicados en la defensa y que, a su vez, pueden ser considerados como bioactivos, es decir con un efecto farmacológico importante (Gutiérrez Mañero et al., 2003; Al-Tawaha et al., 2005). En este sentido, los resultados obtenidos evidencian la relación cada vez más directa entre las rutas defensivas y los metabolitos con actividad farmacológica, tanto los compuestos de origen fenólico, como los terpenicos y alcaloides, tiene un papel importante como metabolitos defensivos y protectores frente a diferentes situaciones de estrés abiótico y antioxidantes con propiedades regenerativas de gran importancia para la salud humana a través de la alimentación.

Nuestra hipótesis de trabajo se establece sobre la base de que ciertas bacterias, o sus productos metabólicos, asociadas a modelos moleculares, incrementan los niveles de metabolitos relacionados con los mecanismos defensivos de las plantas y, en general, afectan al metabolismo secundario, por lo tanto, el empleo de dichas bacterias para estimular la producción de metabolitos secundarios, parece una buena alternativa para incrementar tanto la producción primaria de forma sostenible y mejorar sus cualidades funcionales, así como para proteger a las plantas frente a posibles plagas en los campos de cultivo.

Por otro lado, el empleo de líneas celulares para la producción de metabolitos secundarios proporciona una independencia del crecimiento y desarrollo de la planta, constituyendo una buena posibilidad para la producción de principios activos destinados a la preparación de complementos alimenticios o de medicamentos. Esta producción puede ser potenciada o alterada, bien con el empleo

directo de cepas bacterianas o bien, mediante la aplicación de algunos de sus componentes celulares o metabolitos (elicitors moleculares bacterianos) que puedan provocar el mismo efecto.

Basándonos en la hipótesis de trabajo, los objetivos concretos que se plantean en esta tesis se establecen para el estudio de una aproximación biotecnológica en procesos de elicitation que relacionan el metabolismo defensivo de las plantas con la producción de metabolitos con interés farmacológico y/o alimentario:

Objetivo 1. Desarrollo de screening en sistema rizosférico de la Solanaceae *Nicotiana glauca* Graham, planta seleccionada por su capacidad de adaptación y colonización de ambientes adversos, con metabolismo secundario basal activo y filogenéticamente próxima a plantas de interés agroalimentario.

-Aislamiento de cepas rizosféricas absorbiendo la máxima variabilidad edáfica y climatológica.

-Selección en base a sus potencialidades in vitro para inducir resistencia sistémica frente a patógenos.

-Selección en base a sus potencialidades in vivo para inducir resistencia sistémica frente a patógenos y promoción de crecimiento en una Solanacea modelo de interés agroalimentario, *Solanum lycopersicum*.

Objetivo 2. Estudio de los mecanismos de inducción de resistencia sistémica en planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Determinación de mediadores de la transducción de la señal y rutas de transducción implicadas en la respuesta. Estudio realizado con cepas procedentes del objetivo 1.

Objetivo 3. Estudio de la capacidad de elicitation del metabolismo secundario en *Hypericum perforatum*, planta de interés farmacéutico en planta entera. Estudio de la capacidad de inducción del metabolismo secundario por elicitors bacterianos en cultivo celular in Vitro. El estudio se realiza con cepas procedentes del objetivo 1.

Objetivo 4. Estudio de la capacidad de elicitation de metabolismo secundario en planta leguminosa (*Glycine max*) por cepas beneficiosas y por sus elicitors, procedentes del objetivo 1.

Para alcanzar los objetivos propuestos se realizaron cuatro bloques experimentales independientes, cada uno de ellos descrito en un capítulo de la presente Memoria.

1.4. Bibliografía

Algar, E., Gutiérrez-Mañero, F.J., Bonilla, A., Lucas, J.A., Radzki, W., Ramos-Solano, B. 2012. *Pseudomonas fluorescens* N21.4 metabolites enhance secondary metabolism isoflavones in soybean (*Glycine max*) calli cultures. J Agric Food Chem, 60: 11080-11087.

Alström, S. 1995. Evidence of disease resistance induced by rhizosphere pseudomonad against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J Gen Appl Microbiol, 41: 315-325.

Al-Tawaha, A.M., Seguin, P., Smith, D.L., Beaulieu, C. 2005. Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. Ann Appl Biol, 146: 303-310.

Aoyagi, H., Akimoto-Tomiyama, C., Tanaka, H. 2006. Preparation of mixed alginate elicitors with high activity for the efficient production of 5'phosphodiesterase by *Catharanthus roseus* cells. Biotechnol Lett, 28 (19): 1567-71.

Apel K., Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol, 55: 373-99.

Arshad, M., Frankenberger, W.T. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Adv Agron, 62, 146–151.

Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 97: 239-243.

Baldani, V.L.D., Dobereiner, J. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol Biochem, 12: 433-439.

Barriuso, J., Pereyra, M.T., Lucas García, J.A., Megías, M., Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B. 2005. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-pinus* sp. Microb Ecol, 50 (1): 82-89.

Barriuso, J., Ramos Solano, B., Gutiérrez Mañero, F.J., 2008b. Protection against pathogen and salt stress by four PGPR isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. Phytopathology, 98 (6): 666-672.

Barriuso, J., Ramos Solano, B., Santamaría, C., Daza, A., Gutiérrez Mañero, F.J. 2008a. Effect of inoculation with putative Plant Growth-Promoting Rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. J Appl Microbiol, 105 (5): 1298-309.

Barz, W., Beimen, A., Dräger, B., Jaques, U., Otto, C., Sue, E., Upmeier, B. 1990. Turnover and storage of secondary products in cell cultures. En: Secondary products from plant tissue culture. Charlwood, B.V., Rhodes, M.J.C. (eds.). Clarendon, Oxford. 79-102.

Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can J Microbiol, 36:591-608.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their

potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Molec Biol*, 35 (4): 1044-1051.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17 (8): 478-486.

Bhagwath, S.G., Hjortso, M.A. 2000. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine. A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *J Biotechnol*, 80: 159-167.

Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 343-350.

Boller, T. 1995. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 189-214.

Boller, T., Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 379-406.

Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P., Ricci, P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and others plants. *Eur J Plant Pathol*, 102: 181-192.

Boué, S.M., Cleveland, T.E., Carter-Wientjes, C., Shih, B.Y., Bhatnagar, D., Mclachlan, J.M., Burow, M.E. 2009. Phytoalexin-enriched functional foods. *J Agric Food Chem*, 57: 2614-2622.

Boué, S.M., Shih, F.F., Shih, B.Y., Daigle, K.W., Carter-Wientjes, C.H., Cleveland, T.E. 2008. Effect of biotic elicitors on enrichment of antioxidant properties and induced isoflavones in soybean. *J Food Sci*, 73 (4): 43-49.

Broeckling, C.D., Huhman, D.V., Farag, M.A., Smith, J.T., May, G.D., Mendes, P., Dixon, R.A., Sumner, L.W. 2005. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot*, 410: 323-336.

Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol*, 12: 181-197.

Burr, T.J., Caesar, A. 1984. Beneficial plant bacteria. *Cr Rev Plant Sci*, 2: 1-20.

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6: 1583-1592.

Capanoglu, E. 2010. The potential of priming in food production. *Trends Food Sci Technol*, 21(8), 399-407.

Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dye, F., Bertrand, C., Prigent-Combaret, C. 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87: 65-77.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C., Lugtenberg, B.J.J. 2000. Root colonization is essential for biocontrol of tomato foot and root rot by the phenazine-1- carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 1340-1345.

Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci*, 16 (10): 524-531.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting ready for the Battle. *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (10): 1062-1071.

Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7 (5): 210-216.

Davison, J., 1988. Plant beneficial bacteria. *Nat Biotechnol*, 6: 282-286.

Devliegher, W., Syamsularif, M.A., Verstraete, W. 1995. Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *App Environ Microbiol*, 61 (11): 3865-3871.

Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res*, 159: 371-394.

Dixon, R.A. Natural products and plant disease resistance. 2001. *Nature*, 411: 843-847.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci*, 22: 107-149.

Doornbos, R. F., van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron Sustain Dev*, 32:227-243.

Dörnenburg, H., Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enz Microb Tech*, 17: 674-684.

Dörnenburg, H., Knorr, D. 1997. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food Technol*, 51 (11): 47-54.

Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., Lemanceau, P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Eur J Plant Pathol*, 104: 903-910.

Durrant, W.E., Dong, X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42:185-209.

Ebel, J., Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol*, 148: 1-36.

Erbs, G., Newman, M.A. 2011. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol*, 13(1), 95-104.

Estévez, J., Dardanelli, M.S., Megias, M., Rodríguez-Navarro, D.N. 2009. Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions. *Symbiosis*, 49:29-36.

Eswaranandam, S., Salyer, J., Chen, P., Lee, S.O. 2012. Effect of elicitor spray at different reproductive stages on saponin content of soybean. *J Food Sci*, 77(2): 81-86.

- Farber, K., Schumann, B., Miersch, O., Roos, W. 2003. Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry*, 3: 491-500.
- Flores-Sánchez, J.I., Ortega-López, J., Montes-Horcasitas, M., Ramos-Valdivia, A.C. 2002. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*, *Plant Cell Physiol*, 43 (12): 1502-1509.
- Garbaye, J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol*, 128:197-210.
- Gaskins, M.H., Albrecht, S.L., Hubbell, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. *Agr Ecosyst Environ*, 12: 99-116.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119: 329-339.
- Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K., Pasternak, J.J. 1994. 1-aminocyclopropae-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can J Microbiol*, 40: 911-915.
- Göhre, V., Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, 46: 189-215.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 18: 277-284.
- Gutiérrez Mañero, F.J., Acero, N., Lucas, J.A., Probanza, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, 182: 67-74.
- Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A., Barrientos Casero, M.L. 2003. Systemic induction of terpenic compounds in *D. lanata*. *J Plant Physiol*, 160: 105-130.
- Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talón, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *B. pumilus* and *B. licheniformis* CECT 5106 produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum*, 111: 206-211.
- Hadwiger, L.A. 1999. Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan. En: *Chitin and Chitinases*. Jolles, P., Muzzarelli, R.A. (eds.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 185-200.
- Hamada, H., Kurusu, T., Okuma, E., Nokajima, H., Kiyoduka, M., Koyano, T., Sugiyama, Y., Okada, K., Koga, J., Saji, H., Miyao, A., Hirochika, H., Yamane, H., Murata, Y., Kuchitsu, K. 2012. Regulation of a proteinaceous elicitor-induced Ca²⁺ influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, O₅TPC1, in cultured rice cells. *J Biol Chem*, 287(13): 9931-9939.
- Hattori, T., Ohta, Y. 1985. Induction of phenylalanine ammonialyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol*, 26: 1101-1110.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol*, 60: 579-598.

Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere- a critical review. *Plant Soil*, 205: 25-44.

Jones, D.L., Edwards, A.C., Donachie, K., Darrah, P.R. 1994. Role of proteinaceous amino acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant Soil*, 158: 183-192.

Jourdan, E. E., Henry, G. G., Duby, F. F., Dommes, J. J., Barthélemy, J. P. J., Thonart, P. P., Ongena, M.M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 22(4): 456-468.

Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol*, 7: 1809-1817.

Kang, S.M., Khan, A.L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G.J., You, Y.H., Kim, J.G., Lee, I.J. 2012. Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *J Microbiol*, 50 (6): 902-909.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plant Res*, 3 (13): 1222-1239.

Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Hirochika, H. 2010. MAMP-responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. *Plant Signal Behav*, 5(12): 1653-1656.

Kloepper, J.W. 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. En: *Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management*. Metting, F.B.Jr. (ed.). Marcel Dekker, New York. 255-274.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286 (28): 885-886.

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Schroth, M.N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci Anim Plant Sci*. 60-64.

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 7: 39-43.

Kneer, R., Poulev, A., Olesinski, A., Raskin, I. 1999. Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *J Exp Bot*, 339: 1553-1559.

Lakshmanan, V., Kitto, S.L., Caplan, J.L., Hsueh, Y.H., Kearns, D.B., Wu, Y.S., Bais, H.P. 2012. Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 160(3):1642-1661.

Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8: 863-870.

- Leeman, M., van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur J Plant Pathol*, 101: 655-664.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C. 1993. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Sci Techn*, 3: 219-234.
- Leong, J. 1986. Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 24: 187-209.
- Lim, H.S., Kim, Y.S., Kim, S.D. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl Environ Microb*, 57: 510-516.
- Lozovaya, V.V., Lygin, A.V., Zernova, O.V., Li, S., Hartman, G.L., Widholm, J.M. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiol Biochem*, 42: 671-679.
- Lucas García, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Barriuso, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2004. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. *Plant Soil*, 267: 143-153.
- Lucas García, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F.J. 2001. Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs. *J Plant Nutr Soil Sci*, 164:1-7.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*, 63: 541-556.
- Lynch, J.M., 1990. The rhizosphere. Lynch, J.M. (ed.). John Wiley and sons, Chichester. 458 p.
- Mackey, D., McFall, A.J. 2006. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol Microbiol*, 61(6):1365-1371.
- Marilley, L., Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol*, 13:127-136.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Sci Plant Nutr*, 10 (3): 293-319.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J.P., Défago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84: 139-146.
- Merk-Kozackuk, M., Skorupska, A. 2001. Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biol Fert Soils*, 33: 146-151.

Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M. 2010. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 22: 973-990.

Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Phcog Rev*, 1 (1): 69-79.

Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J., Dixon, R.A. 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 17909-17915.

Nosov, A.M. 2012. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin. *Appl Biochem Microbiol*, 48: 609-624

Okon, Y., Labandera-González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem*, 26: 1591-1601.

Oksman-Caldentey, K.M., Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci*, 9 (9): 433-440.

O'Sullivan, D.J., O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev*, 56: 662-676.

Park, K., Kloepper, J.W., Ryu, C.M. 2008. Rhizobacterial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *J Microbiol Biotechnol*, 18(6): 1095-1100.

Patil, J.G., Ahire, M.L., Nitaware, K.M., Panda, S., Bhatt, V.P., Kishor, P.B., Nikam, T.D. 2013. In vitro propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(6):2379-2393.

Patten, C.L., Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3795-3801.

Peck, S.C., Nuhsu, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., Boller T. 2001. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, 13: 1-11.

Perez-Alonso, N., Capote, A., Gerth, A., Jimenez, E. 2012. Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 110 (1): 153-162.

Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8: 1225-1237.

Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1571-1580.

- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Technol*, 26: 252-258.
- Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B., Kneer, R., Cragg, G.M., Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J Med Chem*, 46 (12): 2542-2547.
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N., Gutiérrez Mañero, F.J. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.]] growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, 182 (1): 59-66.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavaraz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem*, 37: 91-102.
- Ramos Solano, B., Algar, E., García-Villaraco, A., García Cristóbal, J., Lucas García, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2010a. Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. Osumi. *J Agric Food Chem*, 58: 1484-1492.
- Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2008a. Physiological and molecular mechanisms of PGPRs. En: *Plant-Bacteria interactions. Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahamd, I., Pichtel, J., Hayat, S. (eds.). Wiley, New York. 41-54.
- Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Gutiérrez Mañero, F.J., 2009. Biotechnology of the rhizosphere. En: *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Kirakosyan, A., Kaufman, P. B. (eds.). Springer publisher, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. 137-162.
- Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M.T., Domenech, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2008b. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98 (4): 451-457.
- Ramos Solano, B., Lucas García, J., García-Villaraco, A., Algar, E., García Cristóbal, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2010b. Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Soil*, 334: 189-197.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 20 (2): 101-153.
- Rodríguez, H., Fraga, R., González, T., Bashan, T. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287: 15-21.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1809-1819.
- Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tarrago, J., Corchete, P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J Biotechnol*, 119: 60-69.

Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21.

Schroth, M.N., Loper, J.E., Hildebrand, D.C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. En: Current Perspectives in Microbial Ecology. Klug, M.J., Reddy, C.A. (eds.). Am Soc Microbiol, Washington DC. 362-369.

Serrano, M., Kanehara, K., Torres, M., Yamada, K., Tintor, N., Kombrink, E., Schulze-Lefert, P., Saijo, Y. 2012. Repression of sucrose/ultraviolet B light-induced flavonoid accumulation in microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 158(1): 408-422.

Soylu, S., Bennett, M.H., Mansfield, J.W. 2002. Induction of phytoalexin accumulation in Broad Bean (*Vicia faba* L.) cotyledons following treatments with biotic and abiotic elicitors. Turk J Agr For, 26: 343-348.

Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil, 312: 15-23.

Spanu, P., Grosskopf, D.G., Felix, G., Boller, T. 1994. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. Plant Physiol, 106: 529-35.

Tang, W.H. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Ryder, M.J., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (eds.). Adelaide, Australia: CSIRO, Division of Soils. 267-273.

Terry, L., Joyce, D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biol Technol, 32(1): 1-13.

Thomma, B.P.H.J., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W.F. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Aternaria brassicicola*. Plant J, 19: 163-171.

Ton, J., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C. 2006. The relationship between basal and induced resistance in *Arabidopsis*. En: Multigenic and induced systemic resistance in plant. Tuzun, S., Bent, E. (eds.), Springer, New York. 197-224.

Ton, J., Van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. 2002. Differential effectiveness of SA-dependent and jasmonate- and ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. Mol Plant Microbe Interact, 15: 27-34.

Toro, M., Azcón, R., Barca, J.M. 1998. The use of isotopic dilution technique to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. New Phytol, 138: 265-273.

Toyoda, H., Utsumi, R. 1991. Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. U.S. patent N° 4,988,586.

- Uknes, S., Winter, A.M., Delaney, T.P., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 6: 692-698.
- Valueva, T.A., Revina, T.A., Gvozdeva, E.L., Gerasimova, N.G., Il'inskaia, L.I., Ozeretskovakaia, O.L. 2001. Effect of elicitors on accumulation of protease inhibitors in injured potato tubers. *Appl Biochem Microbiol*, 37 : 512-516.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Corné, M.J.P., Ton, J. 2006. Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 5602-5607.
- van Hulten, M., Ton, J., Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M. 2010. Plant defense signaling from the underground primes aboveground defenses to confer enhanced resistance in a cost-efficient manner. En: *Plant Communication from an Ecological Perspective, Signaling and Communication in Plants*. Baluska, F., Ninkovic, V. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 43-60.
- van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting bacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119: 243-254.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36:453-483.
- van Loon, L.C., Glick, B.R. 2004. Increased plant fitness by rhizobacteria. En: *Molecular Ecotoxicology of Plants*. Sandermann, H. (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 177-205.
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44:135-162.
- van Peer, R., Niemann, G. J., Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 91: 728-734.
- van Wees, S.C.M., van der Ent, S., Pieterse, C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol*, 11(4): 443-448.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, CY., Tsay, H.S. 2004. Studies on the production of some important metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin*, 45: 1-22.
- Vasconsuelo, A., Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci*, 172: 861-875.
- Vasconsuelo, A.A., Giulietti, A.M., Boland, R. 2004. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Sci*, 166: 405-413.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nicolaeva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71: 137-44.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J*, 8: 351-358.

Wei, G., Kloepper, J.W., Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant-growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81: 1508-1512.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 26: 379-407.

Wink, M., Alfermann, A.W., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhovel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzaden, A., Wildi, E., Ripplinger, P. 2005. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resour*, 3: 90-100.

Yamaguchi, T., Ito, Y., Shibuya, N. 2000. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense response. *Trends Glycosci Glyc*, 12: 113-120.

Yu, L.J., Lan, W.Z., Qin, W.M., Xu, H.B. 2002. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells, *Process Biochem*, 38: 207-210.

Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, H., Stöckigt, J., Weiler, E.W., Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. En: *Plant tissue culture and its biotechnological applications*. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. 27-43.

Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., Stacey, G. 2002. Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Am Phytopathol Soc*, 15: 963-970.

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23: 283-333.

Zhao, J., Fujita, K., Yamada, J., Sakai, K. 2001. Improved b-thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55: 301-305.

Zipfel C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764-767.

Zook, M. 1998. Biosynthesis of Camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 118: 1389-1393.

Capítulo 2. Artículos Científicos

Esta memoria se basa en la hipótesis del papel fundamental que tiene el sistema microbiano asociado al sistema radical de las plantas sobre el metabolismo vegetal y las consiguientes aplicaciones de los productos derivados del mismo. Este sistema rizosférico microbiano, el microbioma rizosférico, cumple un papel fundamental para que la planta consiga mejorar sus capacidades de adaptación a un ambiente cambiante, que impone condiciones muy variables y con frecuencia estresantes.

Son cuatro los capítulos que constituyen este trabajo y que se exponen de manera enlazada basándose en hipótesis sucesivas. En ellos se pretende evidenciar el potencial de aplicación de las bacterias asociadas a la planta y los distintos enfoques de aplicación biotecnológicos.

En primer lugar, **capítulo 2.1**, se plantea el uso de la rizosfera como fuente de microorganismos especialmente adaptados a la interacción del sistema planta/microorganismos. Un sistema en el que la presión selectiva definida por la planta condiciona el tipo de microorganismos (Marilley y Aragno, 1999, Lucas García et al., 2001, Garbeva, 2004, Barriuso et al., 2005 Hartmann, 2009, Mavrodi, 2012), su diversidad y en definitiva la estructura de las comunidades microbianas que se desarrollan en este ecosistema. Sobre la hipótesis de la capacidad de selección de microorganismos por la planta, primero se busca una planta que aporte una serie de factores de presión-selección que, a priori, puedan resultar de interés para la posterior aplicación específica de las cepas seleccionadas. La planta se elige en base a criterios filogenéticos y metabólicos. Por una parte la planta, *Nicotiana glauca*, es una Solanacea, originaria de America del Sur. Se trata de una planta de carácter invasivo, con una enorme capacidad de adaptación a ambientes secos, gran fortaleza para colonizar suelos pobres y resistir el ataque de agentes patógenos causantes de fuertes daños en otras plantas de la misma familia con gran interés alimentario, como el tomate, *Solanum lycopersicum*, la patata, *Solanum tuberosum* o el pimiento, *Capsicum annum*. Por otra parte, se trata de una planta con un metabolismo secundario muy activo, *Nicotiana glauca* presenta una amplia variedad de alcaloides piridínicos, entre los que se ha encontrado como mayoritario anabasina, que aparece en todos los órganos de la planta. Por las razones expuestas, previsible capacidad de selección microbiana, características de la planta, y proximidad filogenética a plantas de interés agroalimentario, se selecciona esta planta como sujeto de muestreo rizosférico, en busca de un microbioma cultivable y con aplicaciones por sus aportaciones beneficiosas en la interacción.

La búsqueda de cepas con efectos sobre la planta, se realiza sobre un *screening* a gran escala en el que se intenta absorber la máxima variabilidad genética de los microorganismos que se desarrollan en el sistema rizosférico de *Nicotiana glauca*. Posteriormente se realizan las pruebas necesarias para detectar cepas capaces de mejorar de alguna manera la capacidad adaptativa de plantas filogenéticamente relacionadas con *Nicotiana glauca*, como *Solanum lycopersicum*; fundamentalmente se dirige la mejora a la capacidad de crecimiento y a

resistencia a factores de estrés como el ataque de patógenos. Este *screening* se orienta pues a la obtención de las cepas bacterianas más efectivas sobre la fisiología de la planta y que posteriormente podrán utilizarse con fines aplicados.

A continuación, las cepas así seleccionadas pasan a estudiarse por su capacidad para inducir resistencia sistémica en plantas de tomate, especie elegida como modelo de trabajo. La importancia de este tipo de estudios no sólo radica en que las cepas son capaces de proteger a las plantas mediante la mejora de su respuesta inmune, lo que define un enorme potencial de aplicación en sistemas de producción intensivos, sino que además la inducción de las respuestas defensivas innatas de la planta van asociadas con la producción de metabolitos secundarios implicados en la defensa, y que son de gran interés para su aplicación medicinal y alimentario. Esta solución biotecnológica, en principio orientada a mejorar los sistemas defensivos de la planta, solapa por lo tanto con una aplicación de un enorme interés, el desarrollo de alimentos fortificados, alimentos funcionales, o alimentos de mayor calidad con menor aporte de pesticidas y fertilizantes (Capanoglu, 2010).

En una segunda etapa, descrita en el **capítulo 2.2**, una vez comprobada la capacidad de las cepas seleccionadas para proteger a las plantas del ataque de un patógeno modelo, es fundamental conocer los factores desencadenantes de la respuesta, y cómo ocurre la transducción de la señal a nivel fisiológico en la planta. La gran mayoría de los microorganismos patógenos como son, virus, hongos o bacterias, se detectan por la planta mediante el reconocimiento de señales producidas por los propios microorganismos. Estas señales inducen una respuesta de defensa en la planta y se consideran “elicitores”. El conocimiento de los factores capaces de disparar una respuesta defensiva en una planta es fundamental para el posterior manejo de la misma.

La demostración de una respuesta defensiva sistémica mediada por una transducción de señales, con las implicaciones indicadas, permite abordar en los dos siguientes **capítulos (2.3 y 2.4)** la aplicación de las cepas, de los MAMPs, y de los efectores o elicitores metabólicos, en la inducción de respuestas mediadas por metabolitos secundarios. El desarrollo de estos dos capítulos está orientado, por una parte a comprobar la capacidad de las cepas bacterianas o sus elicitores para desencadenar respuestas en otras especies, y por otra, a comenzar la identificación de los elicitores, estructurales o metabólicos; y por último, a determinar la tecnología de aplicación adecuada ya sea en planta o en cultivos celulares.

Los cuatro capítulos indicados constituyen la estructura fundamental de esta memoria y están constituidos cada uno de ellos por una introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y conclusiones, precedidos de una introducción general, hipótesis y objetivos generales de la tesis. A continuación se desarrolla una discusión y conclusiones generales de la tesis, así como una bibliografía en la que enumeran todas las citas bibliográficas que se utilizan en la memoria.

2.1 Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L.

Beatriz Ramos-Solano, Jose Antonio Lucas, Ana Garcia-Villaraco, Elena Algar, Jorge Garcia-Cristobal, Francisco Javier Gutierrez Mañero

Universidad San Pablo CEU. Dept. Biology, Facultad Farmacia. Urb. Monteprincipe, Boadilla del Monte, 28668, Madrid. SPAIN

Publicado: Plant Soil, 2010. 334: 189–197.

Abstract

A screening for Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) was carried out in the rhizosphere of wild populations of *Nicotiana glauca* in south-eastern Spain. Nine hundred and sixty strains were isolated and grouped in four parataxonomic groups: Gram positive endospore forming bacilli, Gram positive non-endospore forming bacilli, Gram negative bacilli and others. Two groups were selected to continue the study: gram negative bacilli since it was the most abundant and gram positive sporulated bacilli, seeking their sporulating capacity as an advantage for inoculants formulation. Ability of strains of these groups to release siderophores and chitinases in vitro were evaluated. Ninety six isolates were siderophore producers, and 56 of them were also able to produce chitinases. Fifty percent of these were tested for growth promotion in tomato. The best results were obtained with 5 gram negative bacilli and one gram positive sporulated bacilli; 5 strains increased all growth parameters while one of them, N21.4, severely compromised plant growth. The ability of these 6 strains to induce systemic resistance against the leaf pathogen *Xanthomonas campestris* in tomato was evaluated. Five of them effectively reduced disease symptoms (up to 50%). The six strains were identified by 16s rDNA sequencing resulting in 3 *Pseudomonas*, one *Bacillus* and 2 *Stenotrophomonas*; it's striking that 2 *Pseudomonas* protected up to 50% while the other increased disease incidence. This indicates that systemic induction is strain specific and not necessarily related to production of siderophores and chitinases.

Keywords: induced systemic resistance, plant protection, PGPR, priming, Solanaceae, tomato

Introduction

Today it is a widely accepted fact that rhizobacteria play a key role in plant health and nutrition. The term Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) coined by Kloepper (1980) includes those strains that benefit plant fitness by many different mechanisms (Ramos Solano et al., 2008a). This term includes those bacteria that enhance plant growth, either by indirect mechanisms such as improving plant nutrition, or by direct mechanisms, that is, involving plant's metabolism, such as producing plant growth regulators (Gutiérrez Mañero et al., 2001), or preventing successful invasion of pathogenic microorganisms triggering plant's defensive metabolism (Bowen and Rovira, 1999; Ramamoorthy et al., 2001; Zhang et al., 2004; van Loon et al., 1998; Ramos Solano et al., 2008b). Knowledge of the rhizosphere and its implications on plant physiology have dramatically changed traditional crop management practices regarding plant nutrition and defensive mechanisms (Ramamoorthy et al., 2001; Lucas García et al., 2004; Domenech et al., 2007; Raaijmakers et al., 2008; Bari and Jones, 2009). Moreover, biotechnological applications of the rhizosphere are yet to be unravelled as there is increasing evidence of bacterial communication involved in the beneficial effects of PGPR on plant growth (Barriuso et al., 2008a).

Nowadays, intensive production of *Solanum lycopersicum* L. (tomato) is fully optimised as regards to nutrient requirements, although sudden pathogen attack accounts for huge economic losses in greenhouses in Southeastern Spain (Lucas García et al., 2004). In order to palliate these pathogen attacks, large amounts of chemicals are used. However, sustainable alternatives need to be developed due to the incoming prohibition of some chemicals for agriculture (CE 2037/2000). Therefore, the use of PGPRs in agricultural crops appears as a challenging alternative, contributing to environmentally safe agricultural practices.

It has been shown that some PGPRs strains inoculated on plant roots trigger the plant's defensive metabolism, and this effect is evidenced only upon pathogen challenge. This physiological status of the plant has been termed **priming** (Conrath et al., 2002) and involves redirection of carbon sources to defensive metabolism, which may compromise plant growth (van Hulten et al., 2006). However, the cost of priming is by far overcome under natural conditions where disease exists. In view of this, it seems interesting to find effective strains.

The rhizosphere of wild plant species is a good source for this purpose (Lucas García et al., 2001; Gutiérrez Mañero et al., 2002; Donate-Correa et al., 2004; Barriuso et al., 2005; Ramos Solano et al., 2007) since plants select those bacteria that are more beneficial for their health by releasing organic compounds through exudates (Lynch, 1990), creating a very selective environment where diversity is low (Marilley and Aragno, 1999; Barriuso et al., 2005). Since our goal was to improve performance of *Solanum lycopersicum* L. the ideal screening would be in wild tomato plants; however, this is not a wild species in Spain, and it was performed in the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham a plant species from the same family (Solanaceae). Native from South

America and naturalized in the Mediterranean area, the genera *Nicotiana*, includes over 40 different species, some of which are relevant in agriculture. Able to colonize poor soils, *N. glauca* contains anabasin, an alkaloid that confers some toxicity, and indicates the existence of a complex secondary metabolism, inducible and probably related to defense (Sinclair et al., 2004; DeBoer et al., 2009). Consequently, our rationale was that the rhizosphere of wild populations of *N. glauca* would be a good source for putative PGPRs effective in other Solanaceae with an agronomic interest.

A screening of 960 strains in the rhizosphere of *N. glauca* was carried out to isolate PGPRs associated to this genus. A subset of 442 isolates constituted by the most abundant parataxonomic groups were characterised based on metabolic activities regarded as putative PGPR traits (siderophores and chitinase production). Fifty percent of the isolates that tested positive for both traits were tested for growth promotion of *Solanum lycopersicum* seedlings and outstanding strains were tested for induction of systemic resistance against *Xanthomonas campestris*. The six strains that performed best were identified by partial sequencing of 16S rDNA.

Materials and Methods

Origin of bacteria

The bacterial screening was carried out in the rhizosphere of wild populations of *Nicotiana glauca* in three different soils (calcareous, volcanic and cuaternary) in southeastern Spain (Coordinates UTM N37°00'00" W1°58'00"; San José, Almería; N36°45'00" W3°10'00", respectively) along two years, 1999 and 2000, in the hot (spring-summer, average temperature 22°C) and cold season (autumn-winter, average temperature 13.2°C) to achieve the maximum edaphic and environmental variability.

Sixteen plants were sampled in each soil (3 soils: calcareous, volcanic and cuaternary) and sampling moment (2 sampling moments: hot and cold). The soil intimately adhered to roots and the thinner roots (diameter 1-2 mm) of four plants were pooled at random and constituted a replicate (4 replicates); each replicate was named with the N from *Nicotiana* and the number of the replicate (N1 to N24). All were brought to the lab in plastic bags at 4°C.

Two grams of rhizosphere soil and thinner roots were suspended in 2 mL sterile distilled water and homogenized for 1 min in an omnimixer. One hundred µL of the soil suspension was used to prepare serial 10-fold dilutions in a final volume of 1mL; 500 µL were plated on Standard Medium Agar (Pronadisa SPAIN) and incubated for 4 days at 28°C. Individual colonies were selected after 36 h and after 4 days of incubation to select fast and slow growing strains. To avoid duplication, isolated colonies were marked on the plate after selection.

Forty colony forming units (cfu) were selected from each serial-dilution series, that is, from each

replicate (4), in each soil (calcareous, cuaternary and volcanic), in the two sampling moments (hot and cold season), constituting 960 cfu. All were isolated and grouped according to Gram staining, morphological characteristics and sporulating capacity into four parataxonomic groups: Gram positive endospore forming bacilli, Gram positive non-endospore forming bacilli, Gram negative bacilli and other morphologies were grouped under "Others". All isolates were kept at -20°C on glycerol:water (1:4).

In vitro tests

All isolates from the selected groups (gram positive endospore forming bacilli and gram negative bacilli) were tested for in vitro production of siderophores (Alexander and Zuberer, 1991) and chitinases (Frändberg and Shunürer, 1998; Rodríguez-Kabana et al., 1983). Fifty percent of the strains able to produce both siderophores and chitinases, were randomly selected to carried out the growth promoting assay.

Inoculum preparation

Bacterial suspensions for inoculation were prepared as follows: each bacterial strain was grown in 100 mL nutritive broth (DIFCO) in a 250-mL Erlenmeyer flask on a shaker (125 rpm) at 28°C for 24 h. The culture was centrifuged (350 g for 10 min), washed with sterile water and pellets were resuspended in sterile MgSO_4 10mM to achieve 10^8 cfu/mL. The enumeration and calculations were carried out following the "drop method" (Hoben and Somasegran, 1982).

The leaf spot pathogen *Xantomonas campestris* CECT 95 was used for the induction of systemic resistance trials. The strain was grown in nutrient broth for 48h at 28°C . The culture was centrifuged (350 g for 10 min), washed with sterile water and pellets resuspended in sterile MgSO_4 10mM to achieve 10^8 cfu/mL.

Growth promotion assay.

The biological effect of 28 selected strains, based on their in vitro measured capacities, on the growth of *Solanum lycopersicum* var. Marmande seedlings was determined. For this purpose, seeds were sown on peat according to the following experimental design: 1392 plants were organized following a random block design with 3 replicates and 8 repetitions: 16 seeds (two per pot) were placed in an eight-pot tray filled with peat (Flora Gard) and covered with a layer of vermiculite; other two trays were prepared in the same way. Each tray was considered a replicate and each plant, a repetition in this replicate ($n=8$); one seedling was removed to adjust to 8 repetitions in each replicate. A total of three trays (24 plants) were prepared for each bacteria (28). The controls were designed in the same way but in this case, these trays were mock-inoculated with MgSO_4 10mM.

Inoculation of putative PGPRs was done on the seedbeds by soil drench upon sowing (Domenech et al.,

2006), with one mL of a bacterial suspension containing 10^8 cfu/mL. Five weeks after sowing, seedlings were harvested and shoot fresh weight, shoot length and calliper were measured. The conditions were the same as those used by plant producing companies during the seedbed phase, before transplanting into the production greenhouse. From sowing until germination, trays were kept in darkness, at 30 °C, and 70 % of relative humidity. When seeds germinated, trays were placed in greenhouse under natural photoperiod; watering was done on alternative days. Once a week, plants were supplied with Hoagland solution.

Systemic induction of resistance assay

Six strains were selected for induction of systemic resistance based on their performance on growth trials. Seeds were sown and grown as described above.

Two hundred and ten plants were used. Seven groups were made, one for each of the bacteria (N21.4, N6.8, N5.18, N17.35, N19.27, N11.37) and one for the non-inoculated controls. Four weeks after sowing, each group was divided in two subsets, leaving one block for pathogen challenge and the other block as the non-pathogen controls, to ensure disease progress. Pathogen blocks were inoculated by deeping plants in the pathogen solution and kept at 100% HR 24h before and after pathogen challenge to ensure estomatal opening. One week after, disease symptoms were recorded. Results are expressed as relative disease incidence, calculated as number of diseased leaves per plant (n=15) over total number of leaves, relative to pathogen control plants that represent 100% disease incidence.

PCR amplification of bacterial 16s rDNA, sequencing and Phylogenetic analysis

Those strains that demonstrated a positive effect on plant growth and were able to induce systemic resistance were identified by 16S rDNA partial sequencing and phylogenetic analyses.

Each bacterial strain was amplified with 16s rDNA primers: P1F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) *E. coli* and P2R (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA (Ulrike et al., 1989). Amplification reactions were made with 5 µL DNA (20 ng/µL), 3 ud Taq polymerase (Roche Expand HighFidelity™ PCR system), 5µL 10x PCR buffer, primers 1 and 2 at 0.5µM and ultrapure water at a 50µL volume. The reaction mixtures were incubated in a thermocycler (PE Cetus DNA thermal cycler) at 95°C for 5 min and then subjected to 30 cycles consisting of 95°C for 60 s, the annealing temperature 64°C for 60s, and 72°C for 2 min. Finally, the mixtures were incubated at 72°C for 6 minutes. Two microliters of each amplification mixture were verified by agarose (1.2% wt/vol) gel electrophoresis in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer containing 0.5 g of ethidium bromide per mL.

The 16S rDNA sequences were combined with Bioedit Sequence Alignment editor 5.0.3®, checked manually, corrected, and then analysed by BLAST. Phylogenetic tree performed with ClustalX 1.8 from the 16s

rDNA gene partial sequences of the following bacteria: N11.37, N5.18, N6.8, N17.35, N19.27 and N21.4. The tree was carried out with the neighbour joining method using sequences of bacteria in GenBank with the greatest homology to ours and *Chloroflexus aurantiacus* (GenBank accession number AJ308501) as negative control (outgroup) Sequence data from this article have been deposited at the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers in table 1.

Table 1. 16S rDNA sequences accession numbers of strains tested for induction of systemic resistance (END: sporulated non deforming)

Strain	Morphology	Gram	Spores	Most significant alignment	Gene-bank accession number
N6.8	Rod	G-	No	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 6B2-1	AY748889
N17.35	Rod	G-	No	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AY748891
N19.27	Rod	G-	No	<i>Pseudomonas corrugata</i>	AY748892
N11.37	Rod	G+	END	<i>Bacillus subtilis</i> strain HJ19	AY748890
N5.18	Rod	G-	No	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY748888
N21.4	Rod	G-	No	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AY748893

Statistical analysis

One way analysis of variance with replicates was used to evaluate the effect of treatments on plant growth parameters and plant protection (Harmann, 1967). When significant differences appeared ($p < 0.05$), a Fisher test was used.

Results

The nine hundred and sixty isolates sampled from the rhizosphere of *N.glauca* from the three different soils and in the hot and cold seasons were classed into the following parataxonomic groups: gram positive endospore-forming bacilli, gram positive non-espoire forming bacilli, gram negative bacilli and all other morphologies were grouped together under the name "other". Two groups were selected to continue the study:

gram negative bacilli since it was the most abundant and gram positive sporulated bacilli, seeking their sporulating capacity as an advantage for inoculants formulation. The 96 siderophore producing isolates were tested for chitinase production, resulting that only 56 of them were able to perform both activities in vitro, being most of them gram negative except for 5 gram positive sporulated bacilli.

Fifty percent of these strains (28) were selected at random for growth promotion assays. Table 2 shows data from all assayed strains on shoot fresh weight, shoot height and calliper. Only eight strains of the 28 assayed significantly affected the three evaluated parameters, 7 enhanced growth (one gram positive endospore forming bacilli N11.37, and 6 gram negative), while one of them, the gram negative N21.4, significantly decreased all parameters.

Table 2. Growth parameters of 5 week old *Solanum lycopersicum* L. seedlings inoculated with chitinolytic and siderophore producing isolates. # denotes strong chitinolytic activity. * indicates significant differences with non-inoculated controls according to Fisher test ($p < 0.05$) ($n=24$)

Bacterial strain	Fresh weight (g)	Height (cm)	Calliper (mm)
Control	1.96 ± 0.18	13.22 ± 0.26	3.08 ± 0.08
N 2.13	1.49 ± 0.11	11.56 ± 0.30 *	2.70 ± 0.09 *
N 5.18 #	2.92 ± 0.08 *	18.10 ± 0.29 *	3.31 ± 0.05 *
N 6.8 #	2.67 ± 0.04 *	18.29 ± 0.40 *	3.36 ± 0.04 *
N 9.13	1.75 ± 0.13	11.80 ± 0.30 *	2.98 ± 0.08
N 9.14	2.28 ± 0.27	13.14 ± 0.44	3.31 ± 0.11
N 10.19	4.25 ± 0.35 *	17.75 ± 0.54 *	3.63 ± 0.10 *
N 10.27	1.86 ± 0.12	12.63 ± 0.19	2.77 ± 0.08
N 10.34	2.05 ± 0.14	13.20 ± 0.25	3.11 ± 0.06
N 10.36	2.27 ± 0.30	13.52 ± 0.45	2.89 ± 0.17
N 11.30	2.22 ± 0.15	13.90 ± 0.35	3.05 ± 0.07
N 11.37 ##	2.66 ± 0.06 *	17.16 ± 0.37 *	3.34 ± 0.06 *
N 13.8	3.69 ± 0.31 *	16.47 ± 0.34 *	3.56 ± 0.08 *
N 13.31	2.67 ± 0.24	15.35 ± 0.29 *	3.28 ± 0.12
N 15.15	1.86 ± 0.06	16.55 ± 0.22 *	2.73 ± 0.06
N 15.30	1.89 ± 0.17	12.65 ± 0.29	2.65 ± 0.08 *
N 16.34	1.59 ± 0.17	12.41 ± 0.34	2.63 ± 0.09 *
N 17.22	2.17 ± 0.2	13.25 ± 0.30	2.81 ± 0.10
N 17.35 #	2.87 ± 0.22 *	15.03 ± 0.45 *	3.66 ± 0.10 *
N 19.22	1.46 ± 0.12	11.74 ± 0.26 *	2.49 ± 0.05 *
N 19.23	1.91 ± 0.13	12.18 ± 0.31	2.62 ± 0.09 *
N 19.27 #	3.18 ± 0.31 *	15.07 ± 0.59 *	3.50 ± 0.14 *
N 20.6	2.09 ± 0.20	13.61 ± 0.37	2.93 ± 0.11
N 21.2	1.85 ± 0.18	12.58 ± 0.32	2.68 ± 0.10
N 21.4 #	1.02 ± 0.07 *	10.75 ± 0.34 *	2.35 ± 0.06 *
N 21.13	2.81 ± 0.17 *	14.04 ± 0.44	2.98 ± 0.09
N 21.26	1.80 ± 0.19	13.92 ± 0.27	3.00 ± 0.10

N 22.18	1.94 ± 0.21	12.41 ± 0.39	3.30 ± 0.14
N 22.29	1.55 ± 0.12	11.63 ± 0.21 *	2.45 ± 0.07 *

Among these eight isolates, those with outstanding chitinase production capacity (N5.18, N6.8, N11.37, N21.4, N17.35, N19.27) were selected and assayed for protection effect against *Xanthomonas campestris*. Interestingly, results in growth promotion were not necessarily associated to protection, as shown by N19.27-inoculated plants that showed even higher disease incidence than controls (Figure 1) associated to a strong growth promotion (Table 2). All other strains protected against the pathogen up to 50% reduction of disease index, being the sporulated bacilli less effective with only a 20% reduction of disease index (Figure 1).

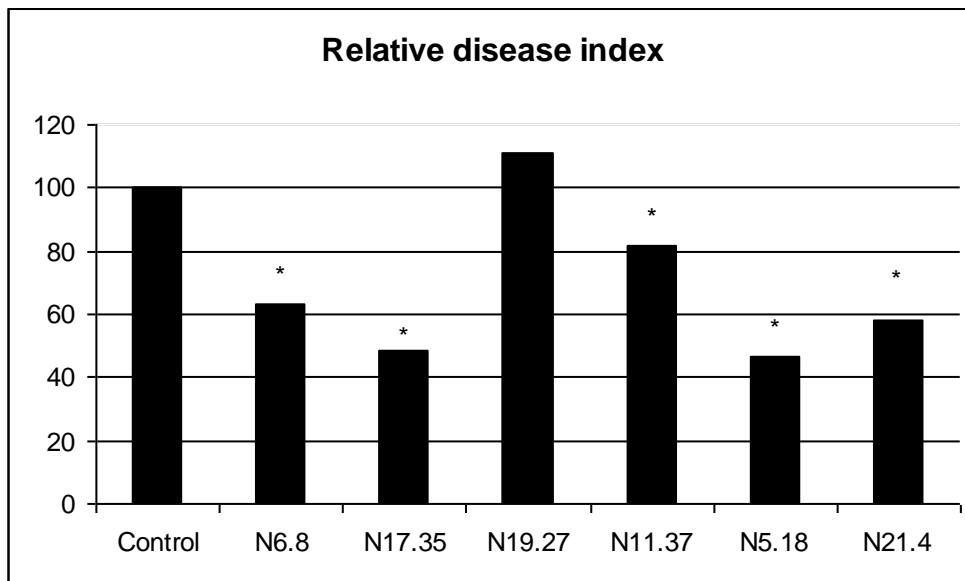


Fig. 1 Relative disease index in *Solanum lycopersicum* L. plants inoculated with the six PGPR and the non-inoculated control, 1 week after challenge with the leaf spot pathogen *Xanthomonas campestris*; the control is expressed as 100% of disease incidence (disease index for pathogen challenged control plants = 75%). Asterisks indicate the existence of significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$) ($n = 15$)

All six strains were identified by 16s rDNA sequencing (Table 1) and the phylogenetic tree is presented in Figure 2. Three were identified as *Pseudomonas* (N21.4, N19.27, N17.35), two *Stenotrophomonas* (N5.18 and N6.8) and one *Bacillus* (N11.37).

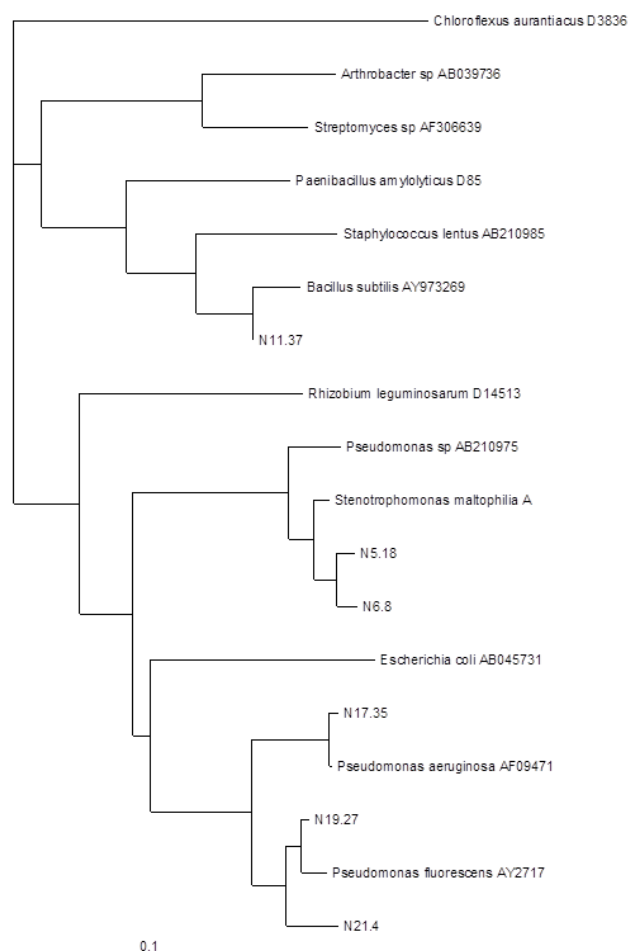


Fig. 2 Phylogenetic tree performed with ClustalX 1.8 from the 16s rDNA gene partial sequences of the following bacteria: 11.37, N5.18, N6.8, N17.35, N19.27 and N21.4. The tree was carried out with the neighbour joining method using sequences of bacteria in GenBank with the greatest homology to ours and *Chloroflexus aurantiacus* (GenBank accession number AJ308501) as negative control (outgroup)

Discussion

This study was carried out to isolate strains with potential to enhance plant fitness in intensive greenhouse production in Southeastern Spain, where *Solanum lycopersicum* is grown in a great part of the area, being the main goal to lower chemical inputs.

Nicotiana glauca was the plant species sampled since it belongs to the Solanaceae family, as tomato, and some specificity between plant species and bacterial strains have been reported (Bent et al., 2001; Ramos et al., 2003). Among the species in this genera, *N. glauca* is the most resistant to different fungal pathogens, and due to this fact, its germoplasm is being used to identify pathogen-resistance related genes in this genera (DeBoer et al., 2009). Based on this good resistance traits and in the inducible nature of secondary metabolism, our rationale was that strains present in the rhizosphere of *N. glauca* would be good candidates to trigger secondary defensive metabolism, so our objective was to isolate them. It's striking that only 10% of the sampled isolates (96) were able to produce siderophores, and only 62 strains were able to produce siderophores and chitinases *in vitro*. This supports the notion of the plant selecting microorganisms to perform one function that is necessary for its survival and reinforces our hypothesis to find the best candidates in the rhizosphere (Barriuso et al., 2005).

Plants encounter a vast array of pathogenic microorganisms that usually deliver effector molecules to cause plant disease (Bari and Jones, 2009). PGPR can improve plant fitness by different mechanisms, including nutrient mobilization, alteration of plant hormonal balance and systemic induction of plant defense (Bowen and Rovira, 1999; van Loon et al., 2006; Ramos Solano et al., 2008a). Considering the agricultural practices in intensive greenhouse production, where plant nutrient requirements are precisely supplied through irrigation, nutrient mobilization was not considered as a criterion to select putative PGPR. However, due to the artificial environment created to maximize plant growth, plant roots are free of natural soil microorganisms that usually colonize roots (Bari and Jones, 2009), preventing contact between pathogenic microorganisms and triggering basal protection mechanisms (van Loon et al., 2006). Therefore, the criteria set for putative PGPRs addressed traits related to plant protection: siderophore and chitinase production (Cattelan et al., 1999; Adesina et al., 2007). Siderophore producing microorganisms protect plants at two levels, first, limiting growth of pathogenic microorganisms (Bevivino et al., 1998) and secondly, triggering plant's defensive metabolism (Gang et al., 1991). Chitin, an insoluble linear polymer, is a major structural component of most fungal cell walls, and therefore, many species of microorganisms and plants produce chitinolytic enzymes to protect themselves against fungi, constituting good biocontrol agents (Lorito et al., 1993; Sid et al., 2003; Adesina et al., 2007). With these criteria, benefits in greenhouse would be achieved at three levels: i) niche colonization (Lucas García et al., 2004), ii) preventing pathogen growth by iron chelation and/or hydrolization of fungal cell walls (Lorito et al., 1993;

Chernin et al., 1995; Adesina et al., 2007), and iii) inducing systemic resistance, activating plant's defensive mechanisms (van Loon et al., 1998; Ramamoorthy et al., 2001; Ramos Solano et al., 1998b).

All isolates triggered plant growth, indicating that communication has been established between both partners, confirming our hypothesis of plant-bacteria specificity based on the phylogenetic relationship. However, only 8 isolates caused significant variations in all 3 biometric parameters. Among these 8 isolates, those with outstanding chitinase production capacity (N5.18, N6.8, N11.37, N21.4, N17.35, N19.27) were selected for evaluation of protection against *Xanthomonas campestris*. All belong to three bacterial genera according to 16s rDNA sequencing (Figure 2) and representatives of all of these genera have been reported in the literature as PGPRs, showing different mechanisms of action (Marten et al., 2001; Gutierrez Mañero et al., 2001; Sid et al., 2003).

Interestingly, results in growth promotion were not necessarily associated to protection. All strains were able to induce systemic resistance protecting the plant up to 50% except N19.27 (Figure 1), and all strains enhanced growth except N21.4 (Table 2). Interestingly, among the 3 isolates identified as *Pseudomonas* only two (N17.35 and N21.4) protected effectively against the pathogen, while the other strain (N19.27) even increased disease symptoms (Figure 1). This reveals that induction of systemic resistance is strain-specific and that siderophores and chitinases are not necessarily the elicitors, suggesting other bacterial metabolites or structural cell wall molecules from bacteria (Ramos Solano et al., 2008b) as putative elicitors. Effects of N21.4 on growth and plant protection is consistent with the priming effect described by van Hulten et al, (2006) that show that upon certain stimuli, plants detour C metabolism to defensive metabolism and growth may be compromised; however, the advantage of this physiological state and the metabolic changes associated to this physiological state is not shown until pathogen challenge, when all defensive metabolism is activated and the plant is protected, revealing a systemic induction of resistance triggered by the elicitor. Interestingly, despite the negative effect on growth registered only for N21.4 treated plants, it protected against the pathogen, like the other 4 strains, speaking of different mechanisms of action depending on the combination plant species-bacterial strain (Bari and Jones, 2009). This is supported by data from Domenech et al. (2007) who demonstrated that these 6 strains were able to trigger systemic resistance also in *Arabidopsis thaliana*, although to a different extent. These authors also showed with *A.thaliana* transgenic and mutant plants that N6.8 triggered systemic protection through a salicylate-dependent pathway while N11.37 seemed to trigger a salicylate-dependent and SA-independent pathways (Domenech et al., 2007). It is also worth mentioning that although N11.37 inoculated plants only showed 20% protection in tomato, it is the same protection degree as in *A.thaliana*, indicating that this strain is quite unspecific. Considering this unespecificity, the effects on growth, its intense chitinolytic activity and siderophore production, its mechanism of action (Domenech et al., 2007) and being a gram positive

sporulated bacilli, N11.37 appears as a good candidate for formulation of biofertilizers.

In summary, and based on the results presented here, the hypothesis to search PGPR in the rhizosphere of wild species that share a phylogenetic relationship and the specific traits set for the search have proved to be suitable for our objective, resulting in 5 effective strains to enhance tomato protection. Except N19.27, all other strains trigger defensive metabolism in tomato effectively. This confirms that the strong pressure in the rhizosphere selects strains able to improve plant fitness by triggering different metabolic pathways to improve performance upon biotic and abiotic challenges. Further studies need to be carried out to unravel underlying mechanism and optimize performance to develop biofertilizers in greenhouse production.

Aknowledgements

This study has been partially founded by Universidad San Pablo CEU (9/99), and for the Spanish government projects: AGL 2005-07923-C05-02/AGR, AGL 2005-24969-E, AGL2006-13758-C05-02/AGR, S0505/AMB/0321.

References

- Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K (2007) Screening of bacterial isolates from various European soils for in Vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biol Biochem* 39:2818-2828.
- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39-45.
- Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473-488.
- Barriuso J, Pereyra MT, Lucas García JA, Megías M, Gutierrez Mañero FJ, Ramos B (2005) Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microb Ecol* 50: 82-89.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Fray RG, Cámara M, Hartmann A, Gutiérrez Mañero FJ (2008a) Transgenic tomato plants alter *quorum sensing* in Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Plant Biotechnol J* 6: 442-452.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Gutiérrez Mañero FJ (2008b) Protection against pathogen and salt stress by four PGPR isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathol* 98: 666-672.

Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can J Microb* 47: 793-800.

Bevivino A, Sarrocco S, Daimastri C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarinin L (1998) Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microb Ecol* 27(3): 225-237

Bowen GD, Rovira AD (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron* 66: 1-103.

Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ (1999) Screening for Plant Growth-Promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63: 1670-1680.

Chernin L, Ismailov Z, Haran S, Chet I (1995) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environm Microbiol* 61: 1720-1726.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7: 210-216.

De Meyer G, Audenaert K, Höfte M (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with a PR1a expression. *Eur J Plant Pathol* 105: 513-517.

DeBoer KD, Lye JC, Aitken CD, Su AKK, Hamill JD (2009) The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis. *Plant Mol Biol* 69: 299-312.

Domenech J, Ramos B, Probanza A, Lucas JA, Gutierrez Mañero FJ (2007). Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*. A study of the putative induction pathway. *Plant Soil* 290: 43-50.

Domenech J, Reddy MS, Kloepper JW, Ramos B, Gutierrez-Mañero FJ (2006) Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol* 51: 245-258.

Donate-Correa J, León-Barrios M, Pérez-Galdona R (2004) Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil* 266: 261-272.

Frändberg E, Shnurer J (1998) Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from airtight stored cereal grain. *Can J Microbiol* 44: 121-127.

Gang W, Kloepper JW, Tuzun S (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum-orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol* 81(12): 1508-1512.

Gutierrez Mañero FJ, Ramos B, Lucas García JA, Probanza A, Barrientos ML (2002) Systemic induction of terpenic compounds in *D.lanata*. *J Plant Physiol* 160: 105-113.

Gutierrez Mañero FJ, Ramos Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M (2001) The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum* 111: 1-7.

Harman JH (1967) *Modern Factor Analysis*. 2nd ed. Univ. Chicago Press, Chicago.

Hoben HJ, Somasegran P (1982) Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Appl Environ Microbiol* 44: 1246-1247.

Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Asadi Rahmani H, Rasuli Sadaghiani H, Miransari M (2009) Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J Plant Physiol* 166(6): 667-674.

Kloepper JW, Scrhoth MN, Miller TD (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathol* 70: 1078-1082.

Lorito M, Di Pietro A, Hayes CK, Woo SL, Harman GE (1993) Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. Appl Environ Microbiol 83: 721-728.

Lucas García JA, Probanza A, Ramos B, Gutierrez Mañero FJ (2001) Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs. J Plant Nutr Soil Sci 164: 1-7

Lucas García JA, Probanza A, Ramos B, Ruiz Palomino M, Gutiérrez Mañero FJ (2004) Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. Agric Environ (formerly Agronomie) 24: 169-176.

Lynch JM (1990) The rhizosphere Wiley-Interscience, Chichester, England.

Marilley L, Aragno M (1999) Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Appl Soil Ecol 13: 127-136.

Marten P, Brueckner S, Berg G (2001) Biological plant protection using rhizobacteria – an environmental friendly alternative for biological control of soilborne and seedborne phytopathogenic fungi. Gesunde Pflanzen 53: 224-234.

Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa T (2006) Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. Plant Soil 286: 167-180.

Pozuelo JM, Gutierrez Mañero FJ, Probanza A, Acero N, Bermudez de Castro F (1995) Effect of alder (*Alnus glutinosa* L.Gaertn) roots on distribution of proteolytic, ammonifying and nitrifying bacteria in soil. Geomicrobiol J 13: 129-138.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y (2008) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil doi 10.1007/s11104-008-9568-6.

Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11.

Ramos B, Garcia JAL, Probanza A, Doménech J, Gutierrez Mañero FJ (2003) Influence of an indigenous European alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) rhizobacterium (*Bacillus pumilus*) on the growth of alder and its rhizosphere microbial community structure in two soils. *New Forests* 25: 149-159.

Ramos Solano B, Pereyra de la Iglesia MT, Probanza A, Lucas García JA, Megías M, Gutierrez Mañero FJ (2007) Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems. *Plant Soil* 289: 59-68.

Ramos Solano B, Barriuso Maicas J, Gutiérrez Mañero FJ (2008a) Physiological and molecular mechanisms of PGPRs. In: Ahamd I, Pichtel J, Hayat S (eds) *Plant-Bacteria Interaction: concepts and technologies for promoting plant growth*, Wiley, New York, pp. 41-54.

Ramos Solano B, Barriuso J, Pereyra MT, Domenech J, Gutierrez Mañero FJ (2008b) Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection and biotic elicitors. *Phytopathol* 98: 451-457.

Rodríguez-Kábana R, Godoy G, Morgan-Jones G, Shelby RA (1983) The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies. *Plant Soil* 75: 95-106.

Sid A, Ezziyyani M, Egea-Gilabert C, Candela ME (2003) Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biologia plantarum* 47(4): 569-574.

Sinclair SJ, Johnson R, Hamill JD (2004) Analysis of wound-induced gene expression in *Nicotiana* species with contrasting alkaloid profiles. *Functional Plant Biol* 31: 721-729.

van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Corné MJP, Ton J (2006) Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *PNAS* 103: 5602-5607.

Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36: 453-483

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162

Zhang S, Reddy MS, Kloepper JW (2004) Tobacco growth enhancement and blue mold protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. *Plant Soil* 262: 277-288.

2.2 Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*: a study of the putative induction pathway.

Jezabel Domenech, Beatriz Ramos Solano, Agustin Probanza, Jose Antonio Lucas García, Francisco Javier Gutierrez Mañero

Universidad San Pablo CEU. Dept. Biology, Facultad Farmacia. Urb. Monteprincipe, Boadilla del Monte, 28668, Madrid. SPAIN

Publicado: Plant Soil, 2007. 290: 43–50.

Abstract

The ability of six putative plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), isolated from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* L., to stimulate growth and induce systemic resistance against *Xanthomonas campestris* CECT 95 in *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 was evaluated. The six bacterial strains significantly reduced the disease symptoms caused by the pathogen compared to the controls, with the best results obtained with the *Bacillus* strain N11.37 and the *Stenotrophomonas* strain N6.8. These two strains were tested on *A. thaliana NahG* plants and *jar1-1* and *etr1-1* mutants, to elucidate whether the salicylic acid (SA)-dependent or SA-independent pathway was involved in the induction of systemic resistance. The results indicate that N6.8 induces the SA-dependent pathway. For N11.37 it is as yet not clear as in the *etr1-1* mutants and *NahG* plants ISR is not expressed, while in *jar1-1* it is. In addition, levels of SA were measured in Col-0 plants treated with N6.8 and N11.37 to confirm whether or not the two strains produced an increased level of SA. N6.8 and N11.37-induced plants showed higher levels of SA than the controls. It is concluded that N6.8 induces a SA-dependent pathway while N11.37 induces a pathway that is both ethylene (ET) and SA-dependent.

Introduction

The rhizosphere is a layer of soil surrounding the plant roots with a high level of microbial activity, due to the nutrients secreted by the roots in the form of soluble exudates such as amino acids, organic acids and other photosynthates (Lynch, 1990). Among the rhizosphere microorganisms, most attention in recent years has focused on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980). This term was first used to describe a group of bacteria which inhabit the rhizosphere exhibiting a beneficial effect on the plant's development, and later extended to include preventing disease caused by pathogen attacks (Van Loon *et al.*, 1998). PGPRs can be found among different bacterial genera such as *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, and *Pseudomonas* (Bowen and Rovira, 1999). The mechanisms by which PGPRs promote growth have already been widely reported (Bowen and Rovira, 1999), while defensive mechanisms pathways, such as induced systemic resistance, are currently being intensively investigated (Van Loon *et al.*, 1998).

Plants possess various inducible defence mechanisms to protect themselves against pathogen attacks. A classic example of this is Systemic Acquired Resistance (SAR), which are activated after infection by a necrotising pathogen. SAR has been demonstrated in many plant species and confers resistance against a broad spectrum of plant pathogens in distant uninfected plant parts (Ryals *et al.*, 1996). Root-colonizing non-pathogenic rhizobacteria induce disease resistance in the host plant, a phenomena that has been termed Induced Systemic Resistance (ISR) (Van Loon *et al.*, 1998). The ISR is a plant mediated mechanism initiated at the roots, that extends up to the shoots; it is phenotypically similar to SAR, as it is effective against different types of plant pathogens. The triggering of disease resistance by non-pathogenic bacteria depends on each different plant species. Hence, it is interesting to find strains that can stimulate a wide array of plants that may be of future commercial interest.

In *Arabidopsis thaliana*, SAR and ISR are regulated by distinct signalling pathways. As found in other plant species, pathogen-induced SAR is associated with local and systemic increases in endogenously synthesised SA, and a coordinated gene expression of genes encoding pathogenesis-related proteins (PR) (Uknes *et al.*, 1993; Lawton *et al.*, 1995). SA is a necessary intermediate in the SAR signal transduction pathway because SA-non-accumulating NahG plants, expressing the bacterial SA hydroxylase gene *NahG*, are impaired in SAR (Lawton *et al.*, 1995). In contrast, there are other bacteria, such as *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, that induce a defensive response that is independent of SA and PR gene activation (Pieterse *et al.*, 1996; Van Wees *et al.*, 1997), but which requires jasmonic acid (JA) and ET signalling. The JA response mutant *jar1-1* and the ethylene response mutant *etr1-1*, which both express normal levels of pathogen induced SAR (Lawton *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1998), did not express ISR when treated with WCS417r, indicating that the ISR-signalling pathway requires components of the JA and ET response (Pieterse *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1999). van Wees *et al.* (2000) also demonstrated that the SAR and ISR pathways can be elicited simultaneously, resulting in an additive effect on the level of induced protection, thus

providing evidence that there is no significant negative interferences between the two pathways. This suggests that the additive effect on the level of induced protection is caused by the induction of complementary NPR1-dependent defence responses that are active against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst).

The rhizospheres of wild plant species seem to be the best sources from which to isolate plant growth promoting rhizobacteria (Gutierrez-Mañero *et al.*, 2003; Lucas Garcia *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, *in press*). Plants have been carrying out an intensive selection process over many years, selecting bacteria that are beneficial to their health by releasing organic compounds through exudates (Lynch, 1990), thus creating a very selective low diversity environment (Marilley and Aragno, 1999). Thus, we reasoned that the rhizosphere of wild populations of one species of the family *Solanaceae*, *Nicotiana glauca*, found in Southern Spain, would be a good source for putative PGPRs in another species of the same family, *Lycopersicon esculentum*. In a previous study, a screening of 1200 bacteria was carried out on the rhizosphere of *N. glauca* (Ramos Solano *et al* unpublished results), and tested for growth promotion and induction of systemic resistance in tomato. The most effective strains (six) were selected for this study on *A. thaliana*.

The aim of this work was, primarily, to study the ability of the six putative PGPR strains on growth promotion and induction of systemic resistance in *A. thaliana* Col-0 against the foliar pathogen *Xanthomonas campestris* CECT 95. Secondly, the most effective strains were studied in detail to elucidate whether a SA-dependent or a SA-independent pathway is involved with NahG plants and mutants *jar1-1* and *etr1-1*.

Materials and Methods

Bacterial strains

Six PGPR strains isolated from the rhizosphere of *N. glauca* L., N5.18 (*Stenotrophomonas*, Gram⁻), N6.8 (*Stenotrophomonas*, Gram⁻), N11.37 (*Bacillus*, Gram⁺), N17.35 (*Pseudomonas*, Gram⁻), N19.27 (*Pseudomonas*, Gram⁻) and N21.4 (*Pseudomonas*, Gram⁻) were used. These bacteria showed siderophore production, chitinolytic activity *in vitro* and demonstrated a growth promotion effect on tomato (Ramos Solano *et al*, unpublished results).

PGPR strains were maintained at -80°C in tryptic soy broth (TSB) amended with 20% glycerol. Inoculum was prepared by streaking strains from -80°C onto tryptic soy agar (TSA) plates, incubating the plates at 28°C for 24 to 30 h, and scraping bacterial cells off the plates into sterile distilled water to yield 10⁹ to 10¹⁰ colony forming units (cfu)/mL. The inoculation process of the PGPRs is described in the "Induction of systemic resistance assay" section.

The leaf pathogens *Xanthomonas campestris* CECT 95 and *X. campestris* CECT 4480 were used for challenge inoculation. Both leaf pathogens were grown in TSB (Tryptic soy broth) medium overnight, at 28°C.

After centrifugation the bacterial cells were re-suspended in 10 mM MgSO₄ and the concentration was adjusted to 10⁷ cfu/mL.

Cultivation of plants

Arabidopsis thaliana L. seeds ecotype Col-0, transgenic NahG plants harbouring the bacterial *NahG* gene (Delaney *et al.*, 1994), and mutants *jar1-1* (Staswick *et al.*, 1992) and *etr1-1* (Bleecker *et al.*, 1988) were sown in quartz sand watered with Hoagland solution. Seedlings were cultivated in a growth chamber (Sanyo MLR-350H) with a 9-h light (350 μE s⁻¹ m⁻² at 24°C) and 15-h dark period (20°C) at 70 % relative humidity. Two-week-old seedlings were transplanted individually to 60 mL pots containing a 12:5 (vol:vol) potting soil:sand mixture, and autoclaved three times for 20 min at 121°C with a 24 h interval between each one. The plants were watered regularly and supplied with half-strength Hoagland solution (Sigma-Aldrich) once a week.

Growth promotion assay

The growth promotion was evaluated on *A. thaliana* L. Col-0 and the six putative PGPRs were assayed. The final density of each rhizobacteria was 10⁸ cfu/g of soil. Biometrical parameters used to determine the PGPR effect were perimeter and shoot area. Twenty plants were used in each treatment. The experiment was repeated twice, with similar results being obtained.

Two-week-old seedlings were transferred to bacterised soil (10⁸ cfu/g soil). Three weeks after inoculation, a second dose of PGPR was applied to seedling roots by a soil drench, to achieve the same bacterial density (10⁸ cfu/g soil). Controls were supplied with the same volume of water. Plants were harvested one week later, and their biometrical parameters recorded.

Challenge inoculation and pathogen selection

This experiment was performed to determine whether *X. campestris* CECT 4480 or *X. campestris* CECT 95 induced more disease symptoms in *A. thaliana* Col-0. The challenge inoculation with the two pathogens was performed using 20 plants per pathogen and 20 for the non-challenged control. Two-week-old seedlings were transferred to a potting soil mixture as described in "Cultivation of plants". The pathogen challenge was performed four weeks after the transplant. One day before the challenge, relative humidity was raised to 100 %, and maintained at 100 % for the following two days. Challenge inoculation was performed by dipping the leaves into a suspension of 2.5 x 10⁷ cfu/mL of the pathogen in 10 mM MgSO₄. Controls were dipped in 10 mM MgSO₄. One week after the challenge, disease severity was assessed by determining the percentage of leaves with disease symptoms (chlorotic dots) per plant (disease index).

Induction of systemic resistance assay

To induce systemic resistance, *A. thaliana* L. Col 0 roots were treated with each of the six putative PGPRs. Two-week-old seedlings were transferred to bacterised soil (10^8 cfu/g soil). Three weeks after inoculation, a second dose of PGPR was applied to seedling roots by a soil drench, to achieve the same bacterial density. One week later, plants were challenged with the pathogen *X. campestris* CECT 95 and disease symptoms recorded, as described above. Results are expressed as a relative disease index, being the disease achieved in pathogen treated control plants as 100%. The experiment was performed twice, with similar results being obtained on each occasion.

To elucidate the transduction pathway involved in the plant's defensive response, the most effective PGPR inducing systemic resistance were inoculated in NahG plants, *etr1-1* and *jar1-1* mutants and were subjected to the pathogen challenge as described previously.

Extraction and quantification of SA

A. thaliana L. Col-0 plants were inoculated with N6.8 and N11.37 as described above for the "Induction of systemic resistance assay". The SA was determined on PGPR-inoculated plants and controls that were not pathogen-challenged 1 week after the second PGPR inoculation. Leaves were frozen in liquid nitrogen and powdered with mortar and pestle; extraction was performed according to Rasmussen *et al.* (1991). For the analysis of free and conjugated SA, 1250 ng of the internal standard *ortho*-anisic acid was added per gram of fresh weight. The SA content was analysed by HPLC according to Rasmussen *et al.* (1991).

Statistical analysis

To evaluate the bacterial effect on growth and systemic induction of resistance, an unidirectional ANOVA was performed. When differences were significant, an LSD test was performed using the computer program Statgraphics plus 5.1, for Windows™.

Results

Pathogen selection

One of the two pathogenic bacterial strains used for the pathogenicity experiments, *X. campestris* CECT 95 caused the highest percentage of disease (57 %), while *X. campestris* CECT 4480 was less virulent (30 %) (Figure 1). *X. campestris* CECT 95 was selected for ISR experiments since its disease symptoms were more evident.

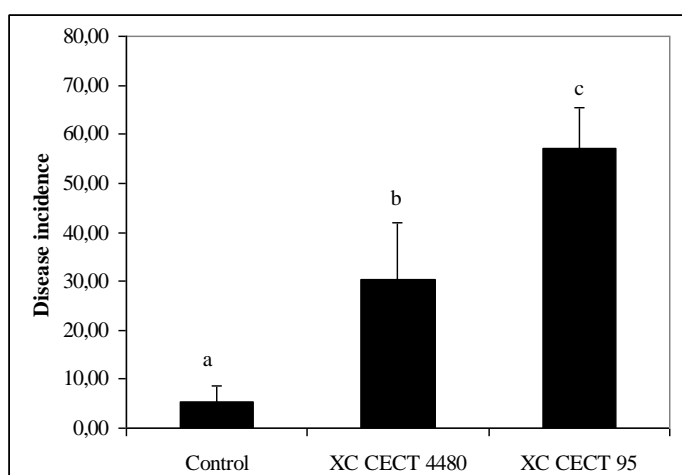


Fig. 1. Disease incidence (percentage of chlorotic leaves per plant) caused by the foliar pathogenic bacterial strains, *X. campestris* CECT 95 and *X. campestris* CECT 4480 in *A. thaliana* Col-0 (n=20). Different letters indicate the existence of significant differences according to LSD ($p < 0.05$)

Growth Promotion assay

The six putative PGPR bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4, N5.18) were tested in *A. thaliana* for their ability to enhance plant growth (Figure 2). The strains N11.37, N17.35, N19.27 and N21.4 showed a significant positive effect on the plant perimeter, compared to the control. All bacterial strains except N6.8 significantly increased shoot surface area compared to the control. However, the best results were achieved with strain N11.37, both in perimeter and plant surface area.

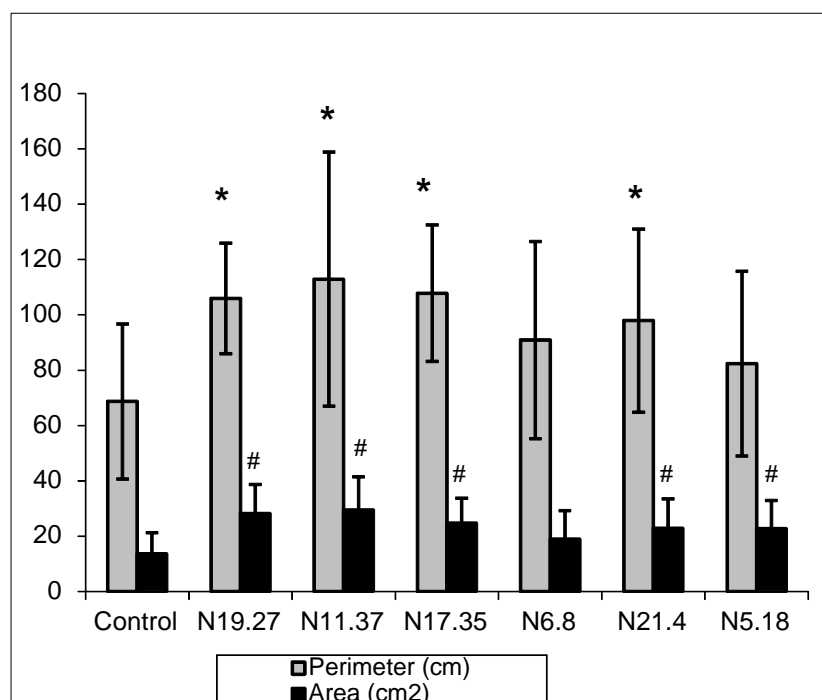


Fig. 2. Growth Promotion assay of the six putative PGPR bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4, N5.18) tested in *A. thaliana* Col 0. Signs (* and #) indicate the existence of significant differences according to LSD ($p < 0.05$)

Induction of systemic resistance assays

Once the PGPR effect had been evaluated in *A. thaliana*, the ability of these strains to induce systemic resistance in *A. thaliana* Col-0 against *X. campestris* CECT 95 was evaluated (Figure 3).

All the strains significantly reduced disease symptoms compared to the control. However, N11.37 and N6.8 produced the best results, reducing the disease index by up to 70 % compared with the pathogen control.

Following the initial evaluation, these two strains were studied in order to elucidate which pathway each of the strains follows to induce systemic resistance against *X. campestris* CECT 95; NahG plants and *jar1-1* and *etr1-1* mutants were used as NahG plants are SA deficient, while *jar1-1* and *etr1-1* are JA and ET response deficient, respectively. Strain N6.8 significantly reduced disease symptoms in *etr1-1* and *jar1-1* mutants (28 and 26%, respectively) compared to the non-PGPR controls (Figure 4). However, in NahG plants, the disease symptoms were the same (100%) in the control and N11.37- or N6.8- inoculated plants. On the other hand, N11.37 did not induce resistance neither in *etr1-1* mutants nor in NahG plants, though the disease index was significantly reduced in the case of *jar1-1* mutants (33%).

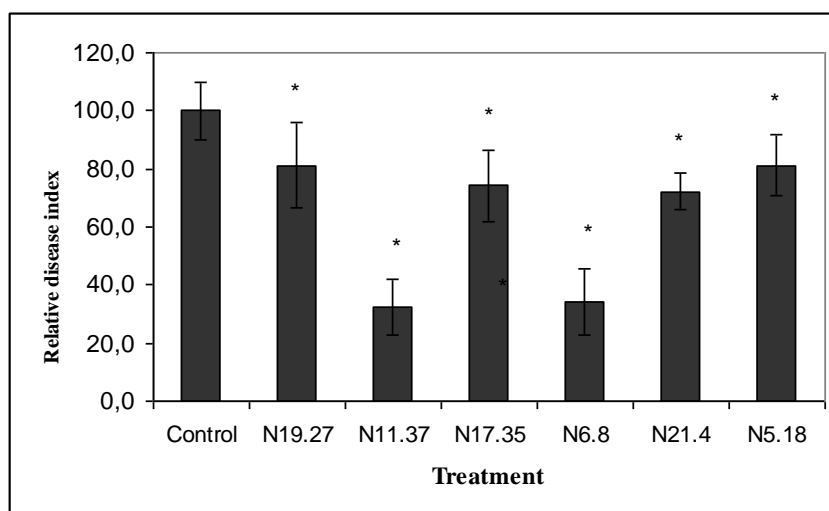


Fig. 3. Relative disease index in *A. thaliana* Col-0 plants against *X. campestris* CECT 95 elicited with PGPR bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4, N5.18). Asterisks indicate the existence of significant differences according to LSD ($p < 0.05$)

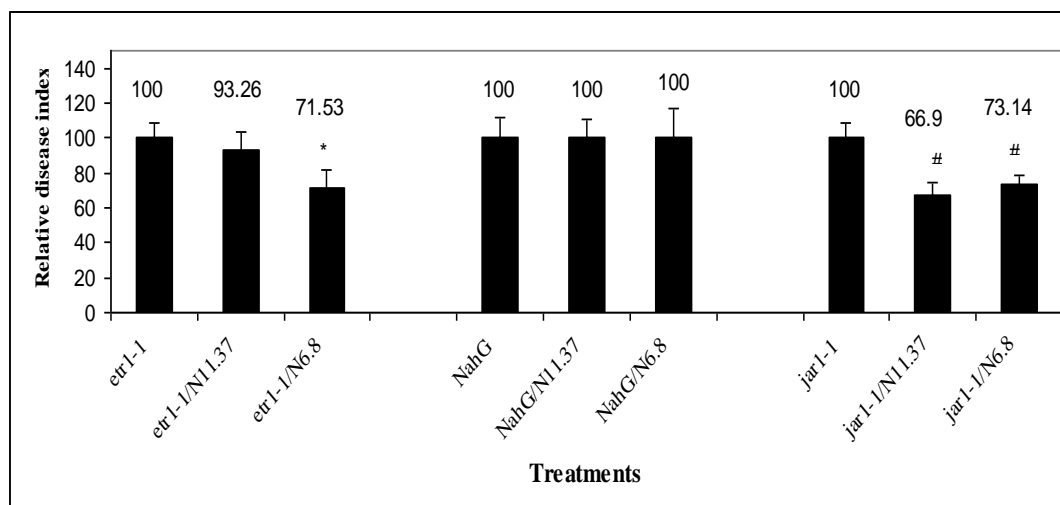


Fig. 4. Relative disease index of PGPRs inoculated-NahG plants, *etr1-1* and *jar1-1* mutants. Signs (* and #) indicate the existence of significant differences according to LSD ($p < 0.05$)

Salicylic acid

To complete the experiments performed with NahG plants and *jar1-1* and *etr1-1* mutants, total and free levels of SA were determined in *A. thaliana* Col-0, induced with N6.8 and N11.37 bacterial strains. Both free and total SA levels were measured in the whole plant one week after the second inoculation with the PGPR (Figure 5). As expected, N6.8-mediated ISR was SA-dependent, and total and free levels of SA were significantly higher in N6.8-elicited plants compared to the control. Indeed, these high levels confirmed the experiment performed using NahG plants, *etr1-1* and *jar1-1* mutants, indicating that the pathway followed by this strain to induce ISR is SA-dependent.

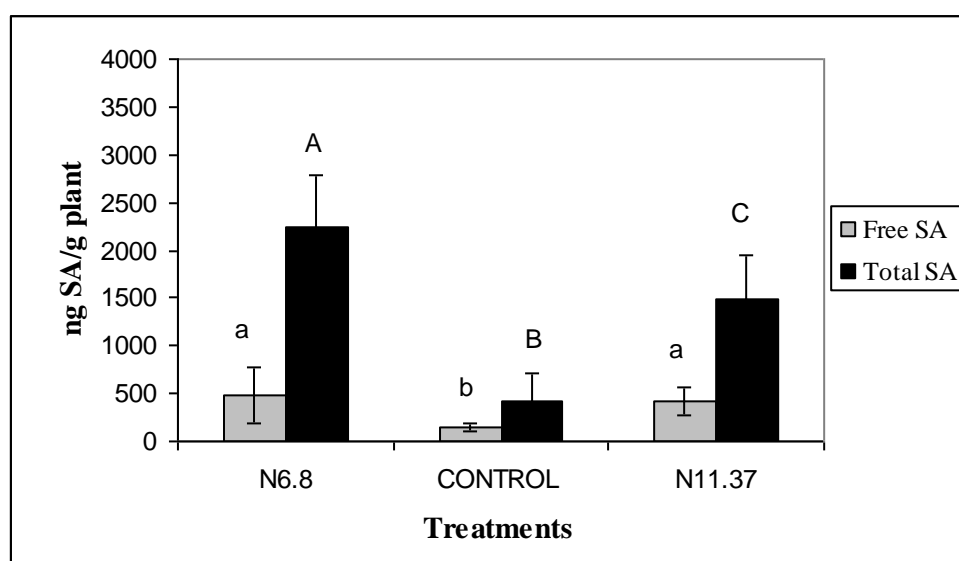


Fig. 5. Total and free levels of SA determined in *A. thaliana* Col-0, induced with N6.8 and N11.37 bacterial strains. Different letters indicate the existence of significant differences according to LSD ($p < 0.05$)

The bacterial strain N11.37 showed lower amounts of total and free SA (1483.5 and 416.9 ng/g of fresh weight, respectively). However, these results showed significant differences compared to N6.8 and the control. These results indicate that N11.37 mediated ISR is also associated with changes in SA levels.

Discussion

It is believed that PGPRs can be used to develop “biofertilizers” to improve productivity in intensive greenhouse production. It should be noted that all the strains used in this study promoted growth of tomato (Ramos Solano *et al.*, unpublished results) and they were also effective on *A. thaliana*. Although *A. thaliana* is not related to the *Solanaceae* this lack of specificity has recently been reported for other PGPRs on *A. thaliana* (Ryu *et al.*, 2005).

Regarding the induction of systemic resistance, our results show that all strains assayed significantly decreased disease symptoms in comparison with the control, thus, inducing systemic resistance (Figure 3). It should be noted that the *Bacillus* showed the best results compared to the other five strains assayed. Induction of systemic resistance by the *Bacillus* strains has been previously reported (Kloepper *et al.*, 2004) although this ability is generally attributed to G^- strains. The different effects can be attributed to differences in bacterial cell wall composition (Yamaguchi *et al.*, 2000).

This work also attempted to determine the mechanism used to induce systemic resistance in the most effective strains.

Previous research has shown that JA and SA pathways are mutually antagonistic. This has been proposed as central to the plant's ability to fine-tune the induction of its defences in response to different plant pests and pathogens. Disease symptoms were significantly reduced by strain N6.8 in *etr1-1* and *jar1-1* mutants (Figure 4). However, this strain did not induce systemic resistance in NahG plants. Therefore, N6.8-mediated ISR was SA-dependent, confirmed by the significantly higher levels of SA than those found in the control Col-0 plants.

However, there is a growing body of literature that reports that JA, SA and ET defence signalling pathways do not function independently. Rather, they are involved in a complex signalling network in which the different pathways influence each other through positive and negative regulatory interactions. According to studies in tomato (O'Donnell *et al.*, 2001), the induction of defensive mechanisms following infection by *X. campestris* pv *vesicatoria* requires both SA and ET, and the accumulation of SA in infected plants is dependent on ET synthesis. In fact, limited data suggest both positive and negative regulatory interactions between ET and SA signalling pathways. Results from Schenk *et al.*, (2000), suggest that, in *A. thaliana*, SA

and ET may function together to co-ordinately induce several defence-related genes. Lawton *et al.*, (1994) reported that ET potentiated the SA-mediated induction of PR-1 in *A. thaliana*. However, genetic data from the same study suggested that the ET signalling pathway also negatively affected SA-dependent responses. This data, which appears contradictory at first, may reflect the complexity of regulatory cross talk between the SA and ET signalling pathways. Regarding this matter, N11.37 did not induce resistance in either *etr1-1* mutants or in NahG plants, though in the case of *jar1-1* mutants the disease index was reduced by 33% being significantly different compared with the pathogen control. Wild-type plants treated with the *Bacillus* N11.37 showed lower amounts of total and free SA (1483.5 and 416.9 ng/g of fresh weight, respectively), than those treated with N6.8, although both cases were higher than the amounts found in the control (Figure 5). These results indicate that N11.37 mediated ISR is also associated with changes in SA levels, revealing that this strain follows a SA and ET-dependent pathway, or maybe a combination of the SA-dependent and SA-independent pathways. These results show that the induction of systemic resistance in *A. thaliana* by these PGPR does not follow the JA and ET-dependent metabolic pathway described by van Loon *et al.*, (1998). Moreover, the role of SA in the induction of systemic resistance is far from clear (Ran *et al.*, 2005) despite the fact that exogenous application of SA induces systemic resistance in *A. thaliana*, therefore, SA itself must play an important role, independently of the ET-JA-dependent pathway.

On the other hand, many authors have suggested that plant defense mechanisms may depend on the kind of pathogen that attack them. By using *A. thaliana* genotypes affected in their response to either SA, JA or ET, it has previously been demonstrated that basal resistance against *Peronospora parasitica* and TCV is predominantly conferred by SA-dependent defense responses (Delaney *et al.*, 1994; Kachroo *et al.*, 2000), whereas basal resistance against *Alternaria brassicicola* is mainly controlled by JA, and to a lesser extent by ET (Thomma *et al.*, 1998, 1999).

Most of the studies that used the pathogen *X. campestris* demonstrated that it followed a SA-dependent signalling defence pathway. In this study, using the same pathogen, the two selected strains, N6.8 and N11.37 elicit the SA-dependent pathway, which is in accordance with most of the literature.

It may be concluded that the assayed strains isolated from the rhizosphere of *N. glauca* are able to elicit *A. thaliana* growth and systemic resistance. Among them, the most effective strains inducing systemic resistance follow a SA-mediated pathway. Irrespective of the biochemical pathway involved, these strains are able to elicit a response in a broad spectrum of hosts and therefore have a good PGPR potential to be used in intensive agricultural management to decrease chemical inputs directed at pest control.

Acknowledgements

We would like to thank Brian Crilly for editorial help.

References

Bleecker A B, Estelle M A, Somerville C and Kende H 1988 Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. Science 241, 1086-1089.

Bowen G D and Rovira A D 1999 The rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. 66, 1-103.

Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gur-Rella M, Kessmann H, Ward E and Ryals, J 1994 A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266, 1247-1250.

Gutiérrez Mañero F J, Ramos B, Lucas García J A, Probanza A and Barrientos M L 2003 Systemic induction of the biosynthesis of terpenic compounds in *D. lanata* . J. Plant Physiol. 160, 105 –113.

Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner KD and Klessig D F 2000. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene and jasmonate independent. Plant Cell 12, 677-690.

Kloepper J W, Schroth M N and Miller T D 1980 Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70,1078-1082.

Kloepper J W, Ryu C M and Zhang S A 2004 Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Pytopathology 94,1259-1266.

Knoester M, Pieterse C M J, Bol J F and Van Loon L C 1999 Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. Mol. Plant Micr. Interact. 12,720–727.

Lawton K A, Potter S L, Uknes S and Ryals J 1994 Acquired resistance signal in *Arabidopsis* is ethylene independent. Plant Cell 6,581-588.

Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S and Ryals J 1995 Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. Mol. Plant Micr. Interact. 8, 863–870.

Lawton K A, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T and Ryals J 1996 Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J. 10, 71–82.

Lucas García J A, Probanza A, Ramos B, Barrientos M L and Gutiérrez Mañero F J 2001 Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four lupinus species based on PCR-RAPDs as a tool to select potential PGPRs. J.Plant Nutr. Soil Sci. 164, 1-7.

Lynch J M 1990 The rhizosphere. Wiley-Interscience, Chichester, England.

Marilley L and Aragno M 1999 Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Appl. Soil Ecol. 13, 127-136.

O'Donnell P J, Jones J B, Antoine F R, Ciardi J and Klee H J 2001 Ethylene dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. Plant J. 25, 315-323.

Pieterse C M J, Van Wees S C M, Hoffland E, Van Pelt J A and Van Loon L C 1996 *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis gene expression. Plant Cell 8, 1225-1237.

Pieterse C M J, Van Wees S C M, Van Pelt J A, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek P J and Van Loon L C 1998 A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1571-1580.

Ramos Solano B, Pereyra de la Iglesia M T, Probanza A, Lucas García J A, Megías M and Gutierrez Mañero F J. Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded Mediterranean ecosystems. Plant Soil *in press*.

Ran L X, van Loon L C and Bakker P A H M 2005. No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. Phytopathology 95, 1349-1355.

Rasmussen J B, Hammerschmidt R and Zook M N 1991 Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiol. 97, 1342-1347.

Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y and Hunt M D 1996 Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, 1809-1819.

Ryu C M, Hu C H, Locy, R D and Kloepper J W 2005 Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil 268, 285-292.

Schenk P M, Kazan K, Wilson I, Anderson J P, Richmond T, Sommerville S C and Manners J M 2000 Coordinate plant defense response in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11655-11660.

Staswick P E, Yuen G Y and Lehman C C 1992 Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6837-6840.

Thomma B H P J, Erggemont K, Pennicks I A M A, Mauch Mani B, Vogelsang R, Cammue B P A and Broekaert W F 1998 Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15107-15111.

Thomma B H P J, Erggemont K, Tierens F M J and Broekaert W F 1999 Requirement of functional ethylene-insensitive 3 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. 121, 1093-1101.

Uknes S, Winter A M, Delaney T P, Vernooij B, Morse A, Friedrich L, Nye G, Potter S, Ward E and Ryals J 1993 Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Mol. Plant Micr. Interact. 6, 692-698.

van Loon L C, Bakker P A H M and Pieterse C M J 1998 Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453-483.

van Wees S C M, Pieterse C M J, Trijssenaar A, Van't Westende Y A M, Hartog F and Van Loon L C 1997 Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. Mol. Plant Micr. Interact. 10, 716-724.

van Wees S C M, de Swart E A M, van Pelt J A, van Loon L C and Pieterse C M J 2000 Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate- dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8711-8716.

Yamaguchi T, Ito Y and Shibuya N, 2000 Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defence responses. Trends Glycosci. Glycotechnol. 12, 113-120.

2.3 Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures.

F. Javier Gutiérrez Mañero¹, Elena Algar¹, María Soledad Martín Gómez², María Dolores Saco Sierra², Beatriz Ramos Solano¹

1.Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Boadilla del Monte, Madrid, Spain.

2.Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Publicado: Pharmaceutical Biology, 2012. 50(10): 1201-1209

Abstract

Context: *Hypericum perforatum* L. (Guttiferae) appears as an alternative treatment to mild and moderate depression and been traditionally used as a health enhancer based on the phytochemicals hyperforin and hypericin. However, field grown medicinal plants show variable levels of phytopharmaceuticals depending on environmental conditions. Elicitation is a good strategy to trigger secondary metabolism.

Objective: This study explored the ability of 6 rhizobacterial strains to trigger secondary metabolism in *H. perforatum* seedlings and molecular elicitors from the most effective strain N5.18 were tested in shoot cultures.

Materials and methods: Hypericin and pseudohypericin were determined on seedlings and shoot cultures by HPLC. Three putative elicitors from bacterial culture media were assayed in 3 different concentrations.

Results: Strain N5.18 significantly increased hypericin up to 1.2 ppm and pseudohypericin up to 3.4 ppm, over controls (0.3 and 2.5 ppm, respectively) when delivered to seedlings. In shoot cultures, only pseudohypericin was detected (168.9 ppm) and significant increases were observed under the different elicitors, reaching values of 3164.8 ppm with small elicitors in the middle concentration.

Discussion and conclusion: Secondary metabolism in plants is highly inducible due to its role in plant communication and defense. Our findings demonstrate that some beneficial bacterial strains are able to trigger secondary metabolism in *H. perforatum* plants when delivered through the roots and bacterial determinants released to culture media are able to reproduce the effect in shoot cultures. Therefore, these elicitors have a great potential to enhance phytopharmaceutical production.

Introduction

Natural products have provided most molecules for human healing from the early onset of humanity to our days. Knowledge of plants and other natural products is still the most efficient strategy for discovery of new molecules and it has been further improved with modern computation design. A close analysis of medicines coming from the plant kingdom shows that in certain areas like cancer, the percentage of small molecules, new chemical entities that are non-synthetic has averaged 62% over the whole time frame (Newman et al., 2003) In other areas, the influence of natural product structures is quite marked, particularly in the antihypertensive area, where of the 74 formally synthetic drugs, 48 can be traced to natural product structures/mimics.

Nowadays in developed countries, nervous diseases are prevalent and depression is within the most common disorders on primary care. New synthetic molecules targeting serotonine reuptake have been patented, representing a high sanitary expense.

Hypericum perforatum L. (Guttiferae), commonly known as St. John's Wort due to the flowering time, appears as an alternative treatment to mild and moderate depression and its use has become prominent in the last years (Erdelmeier et al., 2000; Di Carlo et al., 2001; Butterweck, 2003; Silva et al., 2005; Lozano-Hernandez et al., 2010; Ruedeberg et al., 2010). In addition, this herb has been traditionally used as a health enhancer, as a wound healer (Suntar et al., 2010), as well as for antibacterial (Schulz, 1995; Saddiqe et al., 2010) anti-viral (Hudson et al., 1991; Pang et al., 2010) and anti-retroviral (Lavie et al., 1989; Chinsembu & Hedimbi, 2010) activities; finally, a strong antitumor effect has been recently reported (Schempp et al., 2002; Beerhues, 2006; Medina et al., 2006). Phytochemical characterization reports hyperforin (a prenylated phloroglucinol) and hypericin (a naphthodianthrone), as the main chemicals responsible for effects on health, although other biologically active constituents, e.g. flavonoids, tannins, are also present (Barnes et al., 2001). The precise mechanism of action for the antidepressant effect of St John's wort is unclear. Initially, attention was focused on hypericin as the constituent believed to be responsible for the herb's antidepressant effects. However, experimental (Chatterjee et al., 1998a, b) and clinical evidence (Laakmann et al., 1998) suggest a combined action of both constituents inhibiting the reuptake of epinephrine and/or serotonin into pre-synaptic axons.

In order to enter the market phytopharmaceuticals must be obtained from plant material either from wild harvesting or agronomic production. However, phytopharmaceutical levels lack reproducibility due to the natural variability of secondary metabolism, responsive to naturally changing conditions (Poulev et al., 2003). It has been shown that enzymatic pathways leading to the synthesis of these phytochemicals are highly inducible (Ebel & Cosio, 1994). This is particularly true for phytochemicals that are well documented for their pharmacological activity, such as alkaloids (Facchini, 2001), phenylpropanoids (Dixon & Paiva, 1995; Farag et al., 2008), and terpenoids (Turlings & Tumlinson, 1992; Trapp & Croteau, 2001). For example, the levels of phytoalexins, a large and structurally diverse group of antimicrobial plant defense compounds, often

increase by 2-3 orders of magnitude following pathogen inoculation or elicitation (Darvill & Albersheim, 1984; Dixon, 1986; Boue et al., 2009). Therefore, it's a relevant issue to find those factors that are able to trigger secondary metabolism to enhance levels of phytopharmaceuticals in plants. Those molecules able to trigger secondary metabolism are termed elicitors and they can be either abiotic factors or biotic factors (Vasconsuelo & Boland, 2007).

The ability of some rhizobacterial strains to trigger secondary metabolism involved in defense to biotic and abiotic stress in some plants has been widely reported (van Loon et al., 1998; Zhang et al., 2004; Ongena et al., 2005; Barriuso et al., 2008; Park et al., 2008; Ramos Solano et al., 2008). Bacterial strains may be identified as pathogens, triggering a cascade of immediate defensive response (Gerber et al., 2006; Millet et al., 2010) or, in some cases, they may be detected as a potential non-aggressive pathogen, and gently trigger secondary metabolism, a *priming* response (Conrath et al., 2002, van Hulten et al., 2006). When the bacteria is able to prime the plant, secondary metabolism is stimulated in such a way that upon subsequent stress challenge the defensive response will be more intense than in non-primed plants. Based on this hypothesis, effective bacterial strains could be used to trigger secondary metabolism in plants with pharmacological interest as well as in edible plants with high added value.

In many cases, these compounds are under detection limits in plant tissues. Tissue culture and whole plant elicitation would also increase amounts of natural products widely used as pharmaceuticals, and a consistent elicitation would result in standardized products in terms of phytopharmaceuticals content (Ramos Solano et al., 2010a). Therefore, the aim of this study was to evaluate the ability of several bacterial strains from different origins to increase levels of phytopharmaceuticals in plants and shoot cultures of *Hypericum perforatum*.

Materials and methods

Bacterial strains

The 6 bacterial strains used in this study N21.4, N5.18, N11.37, N17.35, N6.8, N19.27 were isolated from the rhizosphere of wild populations of *Nicotiana glauca* in a previous work. All six strains were identified by 16s rDNA sequencing: N6.8 as *Stenotrophomonas maltophilia*, N17.35 as *Pseudomonas aeruginosa*, N19.27 as *P. corrugate*, N5.18 as *Stenotrophomonas maltophilia*, N21.4 as *P. fluorescens* and N11.37, the only gram positive, as *Bacillus subtilis* (Ramos Solano et al., 2010b). All of them showed their ability to enhance defense in *Solanum lycopersicum* plants (Ramos Solano et al., 2010b) and in *Arabidopsis thaliana* (Domenech et al., 2007) (Table 1).

Table 1. Characteristics of the PGPR strains used in this work: morphology, Gram stain, spore formation, origin, biological activity, most significant alignment of the 16s RNA gene partial sequence. ISR: Induced Systemic Resistance (modified from Ramos Solano et al., 2010b).

Strain	Morphology	Gram	Spores	Source	Biological Activity	Alignment
N5.18	bacilli	-	-	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) 	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Ramos Solano et al., 2010b)
N11.37	bacilli	+	+	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) 	<i>Bacillus subtilis</i> HJ19 (Ramos Solano et al., 2010b)
N21.4 CECT 7620	bacilli	-	-	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) and <i>Lycopersicon sculentum</i> (Ramos Solano et al., 2010b) 	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ramos Solano et al., 2010b)
N19.27	bacilli	-	-	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) 	<i>Pseudomonas corrugata</i> (Ramos Solano et al., 2010b)
N17.35	bacilli	-	-	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ramos Solano et al., 2010b)
N6.8	bacilli	-	-	<i>Nicotiana glauca</i> rhizosphere	<ul style="list-style-type: none"> • Production of siderophores and chitinases (Ramos Solano et al., 2010b) • ISR in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Domenech et al., 2007) 	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 6B2-1 (Ramos Solano et al., 2010b)

Plant material

Hypericum perforatum var Elixir, seeds were provided by *Semillas Silvestres* (Córdoba, Spain); this variety shows natural high levels of hypericines.

Hypericum perforatum line HP1 was kindly provided by Prof. Kirakosyan. This line was developed in a previous study (Kirakosyan et al., 2004) and identified as a low hypericins producing line. Callus cultures were

developed as previously reported (Kirakosyan et al., 2000a) using deep-green colored calli cultivated separately on a modified Murashige & Skoog agar medium (MS) (Murashige & Skoog, 1962) under continuous light ($40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to induce shoot morphogenesis. This media was used for subculturing shoots under continuous light ($40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 21°C and 50% RH in a SANYO growth Cabinet (MLR-350 S.502.330).

Elicitation assays

All six bacterial strains were used for elicitation of plants and only N5.18 molecular elicitors released to culture media were used for elicitation of shoot cultures based on having the best effects on phytopharmaceuticals contents. Elicitor preparation (bacterial inoculum or molecular elicitors) is explained in the corresponding section

Elicitation of plants with bacteria

Inoculum preparation

Bacterial suspensions for inoculation were prepared as follows: each bacterial strain was grown in 100 mL nutritive broth (DIFCO) in a 250-mL Erlenmeyer flask on a shaker (125 rpm) at 28°C for 24 h. The culture was centrifuged (350 g for 10 min), washed with sterile distilled water and pellets were resuspended in sterile MgSO_4 10 mM to achieve 10^8 cfu/mL. The enumeration and calculations were carried out following the “drop method” (Hoben & Somasegran, 1982).

Plant growth conditions and inoculation

Hypericum perforatum var Elixir seeds were pregerminated on 0.5% agar in the dark for 7 days, then seeds were seeded on vermiculite filled trays at maximum WHC until cotyledons and the first pair of true leaves appeared (two weeks). Then, seedlings were transplanted to 425 mL pots (50 x 60 x 160 mm) filled with a mixture of sterile peat/vermiculite/sand (2/1/1 v/v/v) and were kept in the greenhouse under natural photoperiod for 12 weeks with 2 daily waterings of 3 min each.

Seedlings were inoculated 4 times, every two weeks, being the first inoculation on the stage of cotyledons and 4 pairs of true leaves. Inoculation was done by soil drench with the necessary volume to achieve 10^7 cfu/gram of substrate. Watering was suspended 24 h before and after inoculum delivery to prevent washing.

A total of 120 plants were inoculated, 20 with each strain (6) and leaving a non-inoculated control. Fourteen weeks after germination, plants were harvested and the following parameters were evaluated: shoot length, number of leaf pairs, fresh weight and levels of hypericines.

Elicitation of shoot cultures with molecular elicitors**Extraction of molecular elicitors released by strain N 5.18**

Bacterial elicitors were obtained from a 24 h liquid culture of N5.18. The culture (1L of culture broth, Pronadisa) was started with 1 mL of the bacterial strain in MgSO_4 10 mM buffer, with an OD of 0.7 at 600 nm. After 24 h under continuous shaking at 28°C, culture media was centrifuged at 4000 rpm at 4°C for 20 min and the filtered by 0.2 μm filter to ensure removal of all bacterial debris. This medium was frozen and liophilized. The liophilized powder was suspended in acetone:water (4:1 v/v). The acetone fraction was transferred to a round flask and evaporated in a rotary shaker under vacuum until dryness; this was fraction 1. This residue, non-soluble in acetone, was solubilized in water and centrifuged for 10 min at 4000 rpm at 4°C to remove any solid debris. Then, the supernatant was filtered through a vivaspin filter (10 kDa molecular weigh cut); separation was forced by centrifugation at 4°C for 20 min at 4000 rpm. Two fractions resulted from this process, fraction 2 with molecules under 10 kDa (small fraction) and fraction 3 with molecules over 10 kDa (large fraction). Both were liophilized before use.

In addition, the same process was carried out with sterile culture media. Three control fractions were obtained to discard a potential effect of the culture media composition.

Shoot cultures. Growth conditions and elicitation experiment

Shoot cultures were kept on a medium containing 30 g/L sucrose, 4.3 g/L MS basal salt mixture, 8.0 g/L agar, 0.1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myoinositol, 1 mg/L nicotinic acid, 1 mg/L pyridoxine-HCl, 0.5 mg/L 6-benzyladenine (BA), and 1 mg/L naldixic acid (NAA)] at pH 5.8; all reagents were from SIGMA plant cell culture tested. Shoots were kept under continuous light ($40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 21°C and 50% RH in a SANYO growth Cabinet (MLR-350 S.502.330). Individual leaf samples were examined to confirm gland presence.

Elicitation: the three fractions extracted from the control culture media were assayed first on shoot cultures, at 0.1 ppm. Then, the three fractions from N5.18 were assayed at three different concentrations. Two replicates were used.

Fifty mL of MS culture media without the agar were placed on 100 mL Erlenmeyer flasks. Explants weighing approximately 0.2 g were placed in each flask and elicitors added to liquid media. A non-elicited control was kept for reference. Flasks were kept in a growth chamber under shaking 200 rpm for two weeks. Then shoots were harvested and lyophilized; dry weight was recorded and hypericins determined.

Extraction and determination of hypericins

Plant material was grounded in liquid nitrogen with mortar and pestle, irrespective of its origin (seedlings or shoots). For plant material 400 mg were used for extractions and for shoot cultures 200 mg were used.

Extraction and quantification was done according to Gray et al. (2000). Four hundred mg of the powder (200 mg for shoots cultures) were extracted with 8 mL methanol under continuous shaking at 200 rpm for 2 h at dark. After 10 min to allow precipitation of plant material 600 μ L of the extract were removed and diluted in 5.4 mL acetonitrile-methanol (9:1). Prior to HPLC analyses, samples are cleaned through a 40 μ m diameter, MSP C₁₈-fluorasil (2:1) (60-100 mesh size) cartridge (Análisis Vínicos, Spain). Six mL were loaded on preparatory columns and eluates were injected on HPLC.

Hypericin and pseudohypericin were determined simultaneously on a Beckman HPLC provided with a two pump 125 Solvent Module and a 168 Diode array detector. Chromatographic conditions were: UV detection: 284 nm; a Phenomenex SecurityGurad C₁₈ ODS 4.0 x 3.0 μ m and separation was carried out on a C18 Hypersil Phenomenex column (3 μ m, 100 mm x 4.6 mm), the mobile phase was B = Acetonitrile/triethylammonium acetate 0.1 M in water pH 7.0. Flow was set at 1 mL/min and the injection volume was 20 μ L. Quantification was done interpolating relative area counts into indirect calibration curves for each, done with a commercial standard. The indirect calibration curves were constructed with the commercial hypericin and pseudohypericin (SIGMA). All solvents were HPLC grade (Merck), ultrapure water and mobile phase was degassed prior to use.

Statistical analyses

To evaluate treatment effect on growth and hypericines content, one-way ANOVA were performed. When differences were significant, the Tukey's test was also performed with MiniTab® para Windows.

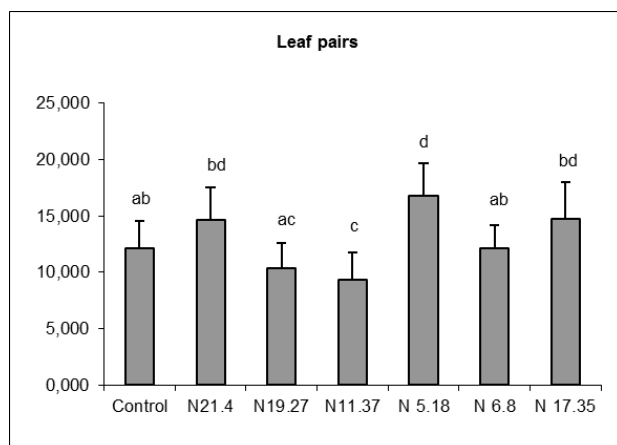
Results

a. Elicitation of plants with bacteria

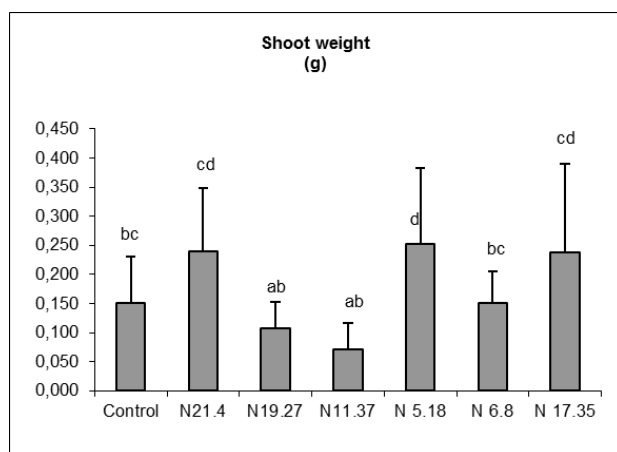
The six bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4 and N5.18) were tested in *Hypericum perforatum* for their ability to enhance plant growth (Figure 1). Strain N5.18 showed a significant positive effect on plant growth, compared to the control; only strain N11.37 significantly increased all parameters while other strains did not produce significant changes.

Hypericin and pseudohypericin content appear in Figure 2. Hypericin levels in non-inoculated seedlings was around 0.35 ppm while pseudohypericin was around 2.5 ppm. Only N21.4 and N5.18 caused a three-fold significant increase in hypericin (Figure 2a) and a moderate but significant increase in pseudohypericin (Figure 2b).

(A)



(B)



(C)

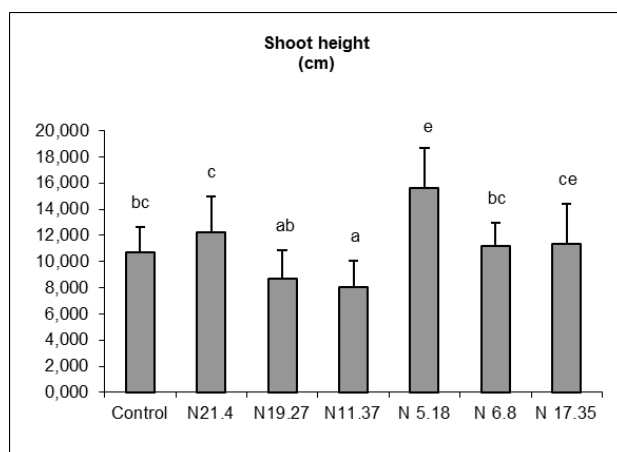
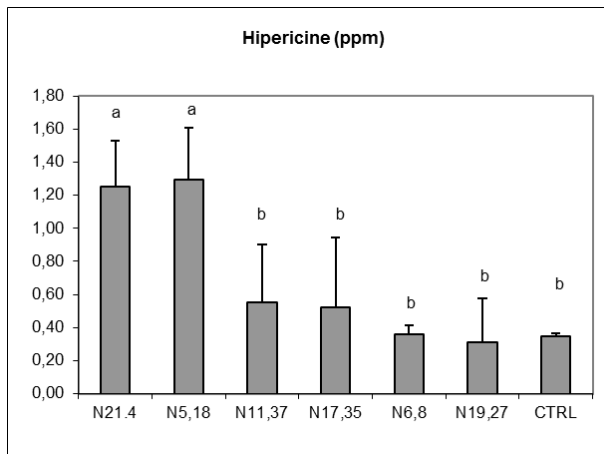


Figure 1. Growth parameters of 12 week old *Hypericum perforatum* var Elixir seedlings inoculated with six bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4 and N5.18) and non-inoculated controls. A) Leaf pairs, B) Shoot weight (g), C) Shoot height (cm). Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

(A)



(B)

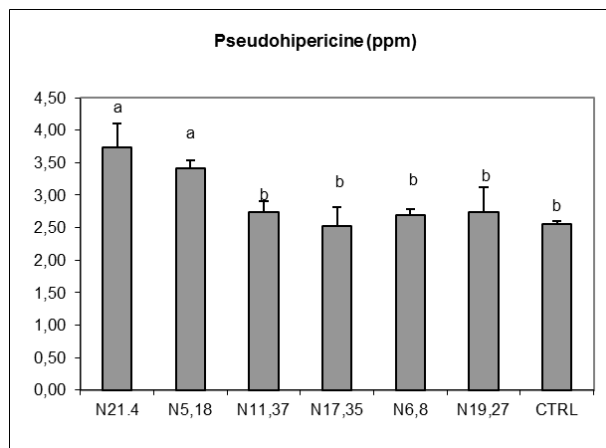


Figure 2. Concentration (ppm) of hypericin (A) and pseudohypericin (B) in 12 week old *Hypericum perforatum* var Elixir seedlings inoculated with six bacterial strains (N19.27, N11.37, N17.35, N6.8, N21.4 and N5.18) and non-inoculated controls. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

b. Shoot culture elicitation. Among the effective strains to increase hypericins in seedlings, N5.18 was selected for elicitation assays in shoot cultures for its better performance on biometric parameters.

Prior to evaluation of the elicitation effects of N5.18, the ability of putative elicitors of control culture media was evaluated on biomass and hypericin contents. Non-significant changes were found on biomass growth or hypericines levels under any fraction from control culture media. Dry weight ranged between 0.85 and 0.97 g after a 15-day growth period (Figure 3). No hypericin was detected and non-significant changes were found on pseudohypericin levels under control culture media fractions at the highest dose (Figure 4).

Then, effects of the three N5.18 fractions at 3 different concentrations each were evaluated on biomass growth and hypericin contents. Neither fraction affected biomass growth (Figure 5). However, significant changes were detected on hypericins under the different elicitors (Figure 6). Fraction 1, involving

acetone soluble compounds, caused a significant 10-fold increase on pseudohypericin levels only at the lowest concentration. Fraction 2, constituted by water soluble compounds under 10 kDa, significantly increased pseudohypericin concentration up to 20-fold with the intermediate concentration. Finally, Fraction 3, constituted by water soluble compounds over 10 kDa, caused a significant 10-fold increase also at the intermediate concentration only.

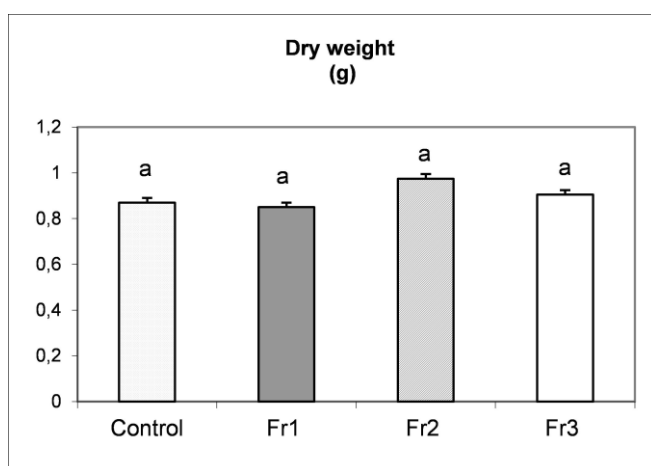


Figure 3. Shoot culture growth (g) obtained with the three fractions of elicitors (Fr1, Fr2, Fr3) from culture media free of bacteria and non-elicited controls. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

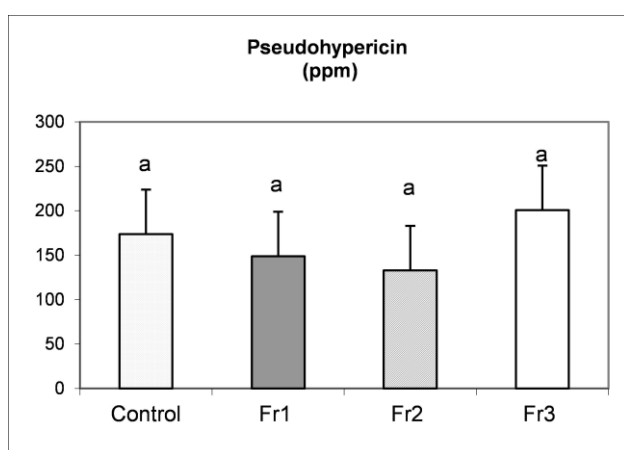


Figure 4. Concentration (ppm) of pseudohypericin in shoot cultures treated with the three fractions of elicitors (Fr1, Fr2, Fr3) from culture media free of bacteria and non-elicited controls. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

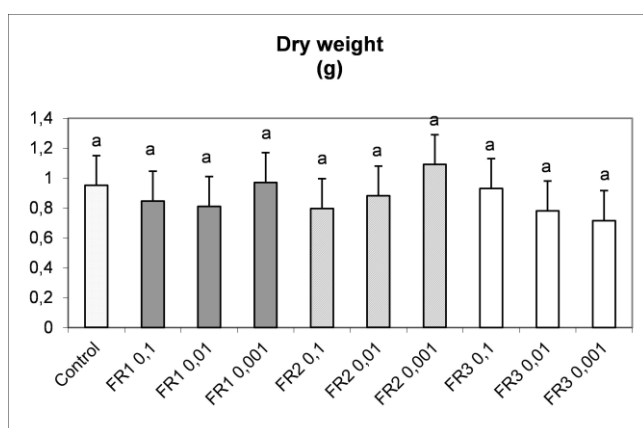


Figure 5. Shoot culture growth (g) obtained with the three fractions of elicitors (Fr1: solid bars; Fr2: strips; Fr3: empty bars) from N5.18 culture media, assayed at three different concentrations (0.1; 0.01; 0.001 mg/mL) each and non-treated control (dotted bar). Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

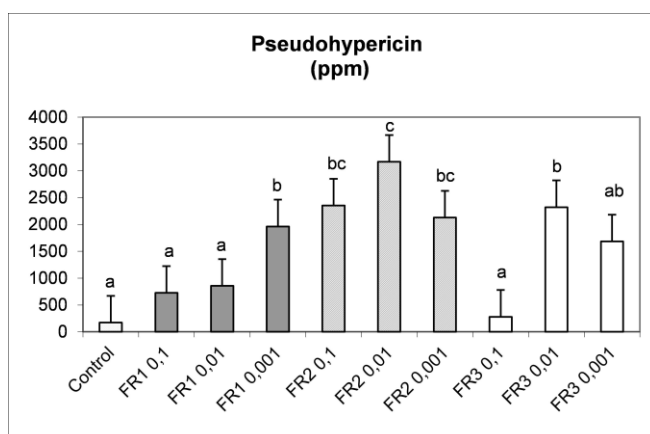


Figure 6. Concentration (ppm) of pseudohypericin in shoot cultures treated with the three fractions of elicitors (Fr1: solid bars; Fr2: strips; Fr3: empty bars) from N5.18 culture media, assayed at three different concentrations (0.1; 0.01; 0.001 mg/mL) each and non-treated control (dotted bar). Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

Discussion

Nowadays, obtaining consistent and reproducible contents of phytopharmaceuticals is a relevant goal in the pharmaceutical industry. These phytopharmaceuticals are secondary metabolites and it's well known that secondary metabolism in plants is highly inducible due to its role in plant communication and defense (Poulev et al., 2003). Hence, in order to overcome the fluctuation of these phytopharmaceuticals under natural environmental conditions, an attempt has been made to obtain these compounds under controlled conditions in plant cell lines. One of the limiting factors of *in vitro* cultures is the lack of differentiation that results in scant accumulation of secondary metabolites. In this case, this problem is overcome by using shoot cultures in which product accumulating glands have been developed (Kirakosyan et al., 2004). However, another limiting factor of *in vitro* culture is the lack of environmental stimuli, and

therefore, our rationale was to identify bacterial strains that have shown their ability to trigger secondary metabolism in *H. perforatum* plants when delivered through the roots and then, use bacterial determinants to reproduce the effect in shoot cultures, enhancing phytopharmaceutical production.

Phytopharmaceuticals present in *H. perforatum* involve three main metabolic pathways: shikimates, terpenes DOXP pathway and poliketides. The condensed naphthodiantrones hypericin and pseudohypericin are poliketides with demonstrated antidepressive effects (Adam et al., 2002). Hyperforin, recently reported as an antitumoral (Schemp et al., 2002) is a phloroglucinol that involves the DOXP pathway and the shikimic acid pathway (Adam et al., 2002). Therefore, *H. perforatum* is of great interest to study induction of secondary metabolic pathways.

In view of the above, the rationale underlying this study relies on the ability of certain PGPR strains to trigger defensive metabolism and hence, secondary metabolism. Therefore, the increase in secondary metabolism of pharmacological interest by delivering PGPRs into plants was set as the challenge of this study based on previous reports (Gutierrez Mañero et al., 2003; Ramos Solano et al., 2010a). Moreover, when this stimulation is considered from an ecophysiological perspective, triggering secondary metabolic pathways will result in an increase in antimicrobial phytoalexins (Boue et al., 2009), or UV protectors like hypericins, processes in which a number of proteins are involved (van Loon et al., 2006). However, not all bacterial strains are able to communicate with all plant species, and there seems to be a recognition pattern in which bacterial determinants are able to trigger plant tissues and start an effective signal transduction (van Wees et al., 2008; Millet et al., 2010).

The bacterial strains used in this study have demonstrated their ability to produce siderophores and chitinases *in vitro*, traits related to induction of systemic resistance (van Loon et al., 1998) and have a well contrasted ability to enhance protection in different plant species like tomato (Ramos Solano et al., 2010b), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae) (Domenech et al., 2007) and soybean (Algar, 2011). This broad spectrum recognition was identified as an asset in this study and the 6 strains were tested on a different plant species *H. perforatum* obtaining positive results as expected in growth (Figure 1) and phytopharmaceuticals (Figure 2). Strains N21.4 and N5.18 performed best significantly enhancing plant growth and hypericins content, being N5.18 the best. Pseudohypericin was more abundant (2 to 3 fold) than hypericin in seedlings, consistent with usual plant contents (Poutaraud et al., 2001). These results show that growth promotion and secondary metabolites content may be related, suggesting that these strains could be releasing plant growth regulators, a mechanism that has been proposed before and is consistent with the unespecificity of these strains. Therefore, these strains could work on an hormonal basis, releasing auxins, salicylic acid or jasmonic acid, that combined with an improvement in plant nutrition mobilizing nutrients from soil would result in an increased growth. Although auxin production has been shown as a common mechanism of rhizosphere bacteria (Azcon & Barea, 1975; Gutiérrez Mañero et al., 1996; Hirsch et al., 1997) ethylene involvement should not be discarded since it has been frequently related to the auxinic effects

(Glick et al., 2007); the combined effect of both results in changes in root growth patterns, increasing root absorption surface and root influence area (Germida & Walley, 1996). When this increase is combined with siderophore production, plant iron nutrition is increased and this is reflected in plant weight. Although bacterial production of gibberellins is not frequent, it has been described for two free living *Bacillus* strains (Gutiérrez Mañero et al., 2001), as N11.37, and in other nitrogen fixing bacteria (Bastian et al., 1998, Atzorn et al., 1988). So, gibberellins would be responsible to increase leaf surface, and the subsequent increase in photosynthetic potential; these two, coupled to increased absorption ability induced by auxins, would result in a better plant fitness. However, further work is necessary to demonstrate this hypothesis for these strains in *H.perforatum* seedlings and establish the multiphasic effect involving hormones and other elicitors (Gutiérrez Mañero et al., 2001; Ramamoorthy et al., 2001). Supporting the notion of plant growth regulators released by bacteria as responsible metabolites for effects on plant growth and secondary metabolism is the well known fact that auxins, salicylic acid and metal jasmonic acid are plant growth regulators that affect phenolic metabolites in cell cultures (Dias et al., 2001; Conceição et al., 2006) and plants (Poulev et al., 2003) by exogenous applications.

After biological assay on seedlings, one bacterial strain was selected based on its effects on plant growth and increase in hypericins. This strain, N5.18 was used to obtain elicitors to be assayed in shoot cultures as it has been shown that *H. perforatum* cells are sensitive to elicitation (Dias et al., 2001; Conceição et al., 2006). The use of elicitors for cell cultures is an emerging tool with a great potential to increase levels of bioactive compounds (Zhao et al., 2005). It has been shown that plant growth regulators affect cell cultures (Dias et al., 2001) and the use of pathogenic microorganisms is just starting. These elicitors are delivered as extracts or fragments to mimic triggering of defensive responses (Dias et al., 2001; Conceição et al., 2006; Boue et al., 2008). Kirakosyan et al. (2000b) showed that mananes from fungal cell walls were able to enhance hypericins in *H.perforatum* cell cultures. As a matter of fact, microbial cell wall polysaccharides are frequently effective elicitors (Yamaguchi et al., 2000; Radman et al., 2003; Zhao et al., 2005; Ramos Solano et al., 2008), although other bacterial metabolites that are not necessarily structural molecules cannot be ruled out. Hence, putative elicitors from N5.18 were extracted from bacterial culture media, targeting water soluble elements released to culture media after 24 h growth. Three fractions were determined: acetone soluble fraction (fraction 1), and two water soluble fractions of different size, over 10 kDa (fraction 3) and under 10 kDa (fraction 2). Since the culture media used is a general media with a complex composition, putative elicitors were also extracted from culture media without bacterial growth and tested on shoot cultures in order to ensure that effects were due to bacterial elicitors and not to culture media composition.

Shoot culture growth was not affected by any of the putative elicitors, nor from the bacteria or from the control culture media. Despite this lack of effect on growth, effects on secondary metabolites were evidenced. Consistent with data in the literature (Kirakosyan et al., 2000a), only pseudohypericin was

detected in shoot cultures. It has been shown that pseudohypericin is by far more abundant in plants than in cell or shoot cultures, and hypericin levels drop dramatically in cell cultures (Poutaraud et al., 2001). Our results support this marked decrease in hypericin in shoot cultures as compared to results from plants, being beyond the detection limit in shoot cultures. However, significant increases in pseudohypericin levels were detected under the 3 fractions containing putative elicitors (Figure 6). Interestingly effects were different depending on the fraction, suggesting the presence of independent effective molecules in each fraction, being fraction 2 (low molecular weight elicitors) the most effective. Results obtained with putative elicitors from control culture media showed no significant effects, confirming that increases found for bacterial elicitors are only due to bacterial elicitors and not to culture media composition, consistent with other authors (Kirakosyan et al., 2000b)

As mentioned before, fraction 2 was by far the most effective on pseudohypericin levels, causing a 15 fold significant increase over controls. This fraction holds water soluble compounds under 10 kDa, released by bacteria to culture media. The literature reports the role of bacterial elicitors to trigger plant secondary metabolism (Yamamoto et al., 1995; Kirakosyan et al., 2000b; Radman et al., 2003). In this case, the effect is not dose dependent, since differences are non-significant between doses. However, fractions 1 and 3, not as effective on increasing pseudohypericin, show a dose-dependent pattern and lower concentrations cause higher increases. This pattern has been reported before for oligosaccharines, molecules detected at very low concentrations in other systems (nM) (Yamaguchi et al., 2000), suggesting that oligosaccharines could be putative eliciting molecules in fraction one.

Conclusions

Irrespective of the eliciting fraction, these are encouraging results for several reasons. First there seems to be at least three different elicitors that are effective triggering pseudohypericin levels, and secondly, low concentrations are effective which is an asset to develop a profitable commercial product. Further studies need to be carried out to determine the minimum effective dose of each elicitor and explore effects on other secondary metabolites of interest such as hypericin and hyperforine.

Acknowledgment

This research was supported by Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/AMB-1511).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Adam P, Argioni D, Bacher A, Eisenreich W. (2002). Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J Med Chem*, 45, 4786-4793.
- Algar E. (2011). Elicitación de sistemas defensivos de *Glycine max* (L.) Merr. en relación con la producción de isoflavonas como compuestos de interés farmacológico y alimentario. PhD thesis. Madrid, Spain.
- Atzorn R, Crozier A, Wheeler CT, Sandberg G. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175, 532-538.
- Azcon R, Barea JM. (1975). Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil*, 3, 609-619.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*, 53, 583-600.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Gutiérrez Mañero FJ. (2008). Protection against pathogen and salt stress by four PGPR isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 98, 666-672.
- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R. (1998). Production of indole-3-acetic and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropidicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg*, 24, 7-11.
- Beerhues L. (2006). Hyperforin. *Phytochemistry*, 67, 2201-7.
- Boue SM, Cleveland TE, Carter-Wientjes C, Shih BY, Bhatnagar D, Mclachlan JM, Burow ME. (2009). Phytoalexin-enriched functional foods. *J Agric Food Chem*, 57: 2614-2622.
- Boué SM, Shih FF, Shih BY, Daigle KW, Carter-Wientjes CH, Cleveland TE. (2008). Effect of biotic elicitors on enrichment of antioxidant properties and induced isoflavones in soybean. *J Food Sci*, 73, 43-49.
- Butterweck V. (2003). Mechanism of action of St. John's wort in depression: What is known? *CNS Drugs*, 17, 539-562.

Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE. (1998a). Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci*, 63, 499-510.

Chatterjee SS, Noldner M, Koch E, Erdelmeier C. (1998b). Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, 31, 7-15.

Chinsembu KC, Hedimbi M. (2010). Ethanomedical plants and other natural products with anti-HIV active compounds and their putative modes of action. *IJBMBR*, 1, 74-91.

Conceição LFR, Ferreres F, Tavares RM, Dias ACP. (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67, 149-155.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7, 210-216.

Darvill AG, Albersheim P. (1984). Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 35, 243-275.

Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. (2001). St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 292-297.

Dias ACP, Seabra RM, Andrade PB, Ferreres F, Ferreira MF. (2001). Santhone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *J Plant Physiol*, 158, 821-827.

Dixon RA. (1986). The phytoalexin response: Elicitation, signaling, and control of host gene expression. *Biol Rev*, 61, 239-291.

Dixon RA, Paiva NL. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Domenech J, Ramos B, Probanza A, Lucas JA, Gutiérrez FJ. (2007). Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*. A study of the putative induction pathway. *Plant Soil*, 290, 43-50.

Ebel J, Cosio, EG. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol*, 148, 1-36.

Erdelmeier CAJ, Koch E, Hoerr R. (2000). *Hypericum perforatum* – St. John's wort chemical, pharmacological and clinical aspects. In: Atta-ur-Rahman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part C)*. New York: Elsevier Direct, 22, 643-716.

Facchini PJ. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 29-66.

Farg MA, Huhman DV, Dixon RA, Sumner LW. (2008). Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol*, 146, 387-402.

Gerber IB, Laukens K, Witters E, Dubery IA. (2006). Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Physiol Biochem*, 44, 369-379.

Germida JJ, Walley FL. (1996). Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biol Fertil Soils*, 23, 113-120.

Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119, 329-339.

Gray DE, Rottinghaus GE, Garrett HEG, Pallardy SG. (2000). Simultaneous determination of the predominant hyperforins and hypericins in St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by liquid chromatography. *J. AOAC Int*, 83, 944-949.

Gutiérrez Mañero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A. (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, 182, 67-74.

Gutiérrez Mañero FJ, Ramos B, Lucas García JA, Probanza A, Barrientos Casero ML. (2003). Systemic induction of terpenic compounds in *D. lanata*. *J Plant Physiol*, 160, 105-130.

Gutiérrez Mañero FJ, Ramos Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talón M. (2001). The plant growth-promoting rhizobacteria *B. pumilus* and *B. licheniformis* CECT 5106 produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum*, 111, 206-211.

Hirsch AM, Fang Y, Asad S, Kapulnik Y. (1997). The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil*, 194, 171-184.

Hoben HJ, Somasegran P. (1982). Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium ssp.* in inoculants made from presterilized peat. *Appl Environ Microbiol*, 44, 1246–1247.

Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GH. (1991). Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res*, 15, 101-112.

Kirakosyan A, Gibson DM, Sirvent T. (2004). A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as sources of hypericins and hyperforins. *J Herbs Spices Med Plants*, 10, 73-88.

Kirakosyan A, Hayashi H, Kenichiro I, Charchoglyan A, Vardapetyan H. (2000b). Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53, 345-348.

Kirakosyan, AB, Vardapetyan RR, Charchoglyan AG. (2000a). The content of hypericin and pseudohypericin in cell cultures of *Hypericum perforatum* L. *Russ J Plant Physiol*, 47, 270-273.

Laakmann G, Schüle C, Baghai T, Kieser M. (1998). St John's wort in mild to moderate depression: The relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, 31, 54-59.

Lavie G, Valentine F, Levin B, Mazur Y, Gallo G, Lavie D, Weiner D, Meruelo D. (1989). Studies of the mechanisms of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 5963-5967.

Lozano-Hernández R, Rodríguez-Landa JF, Hernández-Figueroa JD, Saavedra M, Ramos-Morales FR, Cruz-Sánchez JS. (2010). Antidepressant-like effects of two commercially available products of *Hypericum perforatum* in the forced swim test: A long-term study. *J Med Plant Res*, 4, 131-137.

Medina MA, Martínez-Poveda B, Amores-Sánchez MI, Quesada AR. (2006). Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*, 79,105-111.

Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 22, 973-990.

Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 50, 473-497.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, 66, 1022-1037.

Ongena M, Jourdan E, Schäfer M, Kech C, Budzikiewicz H, Luxen A, Thonart P. (2005). Isolation of an *N*-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 562-569.

Pang R, Tao J, Zhang S, Zhu J, Yue X, Zhao L, Ye P, Zhu Y. (2010). *In vitro* anti-hepatitis B virus effect of *Hypericum perforatum* L. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 30, 98-102.

Park K, Kloepper JW, Ryu CM. (2008). Rhizobacterial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1095-100.

Poulev A, O'Neal JM, Logendra S, Pouleva RB, Timeva V, Garvey AS, Gleba D, Jenkins IS, Halpern B, Kneer R, Cragg GM, Raskin I. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J Med Chem*, 46, 2542-2547.

Poutaraud A, Di Gregorio F, Tin VC, Girardin P. (2001). Effect of light on hypericins contents in fresh flowering top parts and in an extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med*, 67, 254-259.

Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavaraz T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem*, 37, 91-102.

Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot*, 20, 1-11.

Ramos Solano B, Algar E, García-Villaraco A, García Cristóbal J, Lucas García J, Gutiérrez Mañero FJ. (2010a). Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in Glycine max var. Osumi. *J Agric Food Chem*, 58, 1484-1492.

Ramos Solano B, Barriuso Maicas J, Pereyra de la Iglesia MT, Domenech J, Gutiérrez Mañero FJ. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98, 451-457.

Ramos Solano B, Lucas García JA, Garcia-Villaraco A, Algar E, Garcia Cristobal J, Gutierrez Mañero FJ. (2010b). Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Soil*, 33, 189-197.

Ruedeberg C, Wiesmann UN, Brattstroem A, Honegger UE. (2010). *Hypericum perforatum* L. (St John's wort) extract Ze 117 inhibits dopamine re-uptake in rat striatal brain slices. An implication for use in smoking cessation treatment? *Phytother Res*, 24, 249-251.

Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, 131, 511-21.

Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. (2002). Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*, 21, 1242-1250.

Schulz V. (1995). Johanniskraut als pflanzliches Antidepressivum. In: Loew D, Rietbrock N, eds. *Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung*. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 159-175.

Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*, 90, 157-167.

Suntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yesilada E. (2010). Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, 127, 468-477.

Trapp S, Croteau R. (2001). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 689-724.

Turlings TCJ, Tumlinson JH. (1992). Systemic release of chemicals signals by herbivore-injured corn. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 8399-8402.

van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J. (2006). Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 5602-5607.

van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 453-83.

van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 135-62.

van Wees, SCM, van der Ent S, Pieterse CMJ. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol*, 11, 443-448.

Vasconsuelo A, Boland R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci*, 172: 861-875.

Yamaguchi T, Ito Y, Shibuya N. (2000). Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense response. *Trends Glycosci Glyc*, 12, 113-120.

Yamamoto H, Ichimura M, Inoue K. (1995). Stimulation of prenylated flavanone production by mannans and acidic polysaccharides in callus culture of *Sphora flavescens*. *Phytochemistry*, 40, 77-81.

Zhang S; Reddy MS; Kloepper JW. (2004). Tobacco growth enhancement and blue mold protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. *Plant Soil*, 262, 277-288.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23, 283-333.

2.4 La elicitación bacteriana como herramienta biotecnológica para la producción de alimento funcional de alto contenido en isoflavonas a partir de semillas de *Glycine max* cv. Osumi.

Introducción

La soja es una de las plantas de cultivo mas importantes por tratarse de la principal fuente de proteínas en alimentación, por otra parte es también la fuente fundamental de isoflavonas, cuyos beneficios para la salud humana se han descrito ampliamente (Watanabe et al., 2002; McCue y Shetty, 2004; Isanga y Zhang, 2008; Pilšáková et al., 2010). El consumo de alimentos derivados de soja o de suplementos nutricionales a base de soja puede disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular, de ciertos tipos de cáncer, osteoporosis y síntomas asociados a la menopausia. No obstante, existen resultados contradictorios sobre los efectos observados, lo cual es frecuente cuando se trata de compuestos naturales, por una parte las dosis son casi imposibles de ajustar y por otra la variabilidad natural de formas moleculares relacionadas, formas de isoflavonas (IF), y con actividad biológica determinan otra fuente de variación muy difícil de controlar. Aunque la relación parece establecida es necesario aún establecer una relación directa y cuantificable entre el consumo de IF y su efecto sobre la salud.

La tendencia de las sociedades desarrolladas que han alcanzado el concepto de seguridad alimentaria es la mejora de la salud a través de la alimentación, dirigido a la prevención y fortalecimiento de la población sana, fundamentalmente en lo relativo a enfermedades degenerativas. En este marco cobra fuerza el desarrollo de alimentos funcionales o *novel foods* y alimentos fortificados o *fortified foods*.

El concepto de alimento funcional nace en Japón en la década 80. Un alimento funcional es el que proporciona un efecto beneficioso para la salud además de su valor nutricional clásico y tienen por finalidad ayudar a alcanzar una nutrición óptima. Su efecto sobre la fisiología del individuo es independiente de la derivada de los aspectos estrictamente nutricionales. Un alimento funcional es aquel alimento o ingrediente de un alimento que no se ha utilizado para el consumo humano en la UE antes del 15 de mayo de 1997 y que debe ser autorizado por la UE según el reglamento EC 258/97 de 27 de enero de 1997 (fuente: EUROPA - The official website of the European Union, 2011. http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index_en.htm). Desde su aparición a finales de los años 80 hasta nuestros días su presencia se ha incrementado de forma exponencial. Desde 1995 a 2010 ha visto un incremento de casi un 50% (fuente: Nutrition Business Journal (NBJ), 2010. <http://www.nutritionbusinessjournal.com>), fundamentalmente dirigido a prevención de enfermedades cardiovasculares y obesidad. Los alimentos funcionales lo pueden ser de forma natural la como una fruta, que aporta vitaminas, o la soja, que aporta isoflavonas, ya que poseen de forma natural ingredientes bioactivos, es decir, ingredientes que aportan un beneficio para la salud, o pueden ser alimentos suplementados con algún compuesto que no tengan de forma natural, por ejemplo, la leche suplementada

con isoflavonas (alimentos fortificados). El reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos recoge las condiciones de este tipo de alimentos y las fuentes de ingredientes funcionales que pueden ser añadidos a otros alimentos con el fin de transformarlos en funcionales, entre los que se encuentran los extractos de plantas. El desarrollo de este tipo de productos ha supuesto un nuevo mercado para la industria farmacéutica en el campo de los complementos nutricionales. Los Reales Decretos 1487/2009 y 1587/2009 dictan las normas para la regulación y comercialización de los complementos nutricionales en Europa.

Para comercializar un nuevo alimento funcional en la UE se debe presentar un dossier específico con la adecuada información científica (Commission Recommendation 97/618/EC). Entre mayo 1997 y mayo 2004 se han aprobado 14 alimentos funcionales nuevos en la UE y se han rechazado 2; ninguno de ellos a base de soja. (fuente: EUROPA - The official website of the European Union, 2011. http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index_en.htm). Todos estos procedimientos se llevan a cabo en la EFSA (European Food Safety Authority), una agencia de la UE.

Así pues, un alimento funcional a base de soja requiere tener una cantidad de IF conocidas y así poder establecer una relación entre el contenido en IF y su efecto beneficioso sobre la salud. Los datos contradictorios de los efectos sobre la salud de soja que encontramos en la literatura se deben en parte a la falta de caracterización de los productos utilizados. Aquellos que utilizan extractos de plantas no consideran la variación en el contenido de IF que ocurre de forma natural en respuesta a las condiciones naturales (Poulev et al., 2003; Berger et al., 2008; Boué et al., 2008). Por lo tanto, desarrollar un procedimiento para obtener brotes de soja con contenidos de IF constantes y asociados a un efecto sobre la salud sería un primer paso para un nuevo alimento funcional, o para la preparación de extractos estandarizados para poder suplementar otros alimentos. En este sentido, la elicitación aparece como una buena alternativa para lograr este fin (Poulev et al., 2003). Dentro del amplio abanico de elicitors que se han descrito en la literatura científica (Radman et al., 2003) tanto abióticos (Romani et al., 2003; Bennett et al., 2004; Kim et al., 2005; van Hulten et al., 2006) como bióticos (Alves et al., 2004; Boué et al., 2008; Ramos Solano et al., 2008), las bacterias beneficiosas se perfilan como excelentes herramientas para este fin.

El uso de las bacterias rizosféricas, de alguno de sus componentes celulares y de los factores bióticos en general para aumentar el contenido en bioactivos, se ha demostrado en diversos trabajos (Al-Tawaha et al., 2005; Lozovaya et al., 2004; Boué et al., 2008; Ramos Solano et al., 2010; Chamam et al., 2013).

La utilización de cepas PGPRs para aumentar la biomasa vegetal y estimular el metabolismo secundario simultáneamente ya ha sido utilizado en distintas especies vegetales (Gutiérrez Mañero et al., 2003; Lozovaya et al., 2004; Zhang et al., 2004; Al-Tawaha et al., 2005; Wegulo et al., 2005; Boué et al., 2008; Ramos Solano et al., 2010).

El reconocimiento del agente biológico por parte de la planta dispara una serie de cambios metabólicos sistémicos dirigidos a activar el metabolismo defensivo (Zhang et al., 2004; van Loon et al., 1998; Ramos Solano et al., 2008). En algunas especies vegetales como la soja, los metabolitos defensivos son moléculas que tienen actividad farmacológica por lo tanto al utilizar las PGPR como elicitores obtenemos una planta que presenta un mayor contenido de principios activos y además está protegida de forma natural frente al ataque potencial de un patógeno (Conrath et al., 2002; van Hulten et al., 2006; Ramos Solano et al., 2008). Dado que la respuesta natural de una planta frente a un patógeno está mediada por un aumento en las especies reactivas de oxígeno, no es descartable que además del aumento en bioactivos presente un mayor potencial antioxidante.

A la vista de lo anterior, nos planteamos en este estudio un procedimiento de trabajo para obtener brotes de soja con niveles reproducibles de IF y mayor potencial antioxidante utilizando la cepa *Pseudomonas fluorescens* N5.18 para obtener un alimento funcional con un contenido definido de IF y mayor potencial antioxidante o como fuente de ingredientes naturales para fortificar otros alimentos.

Plan de trabajo y objetivos

- Analizar la capacidad de la cepa N5.18 para inducir el metabolismo de isoflavonas en semillas pregerminadas y así mejorar sus cualidades nutricionales.
- Estudiar si la capacidad de elicitación de N5.18 reside en algún producto de su metabolismo liberado al medio de cultivo. Para alcanzar este objetivo se van a comparar los efectos de cepas viables y no viables (irradiadas con dosis letales de luz UV), con los efectos de elicitores moleculares de origen bacteriano liberados al medio de cultivo utilizados en el apartado 2.4.
- Determinar si los efectos son dependientes de la dosis

Material y Métodos

Semillas de *Glycine max*

Las semillas de *Glycine max* empleadas en los experimentos pertenecen a la variedad de ciclo corto denominada Osumi y fueron cedidas por el Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) Las Torres-Tomejil, Sevilla.

Cepa bacteriana con actividad biológica: PGPR

La cepa PGPR empleada en este trabajo fue *Stenotrophomonas maltophilia* N5.18, cuyas capacidades PGPR han sido descritas en el apartado correspondiente (2.3).

Preparación de los inóculos

Se obtuvieron cuatro tipos de inóculos a partir de un preinóculo de N5.18 de D.O.=1,0 a 600 nm (obtenido según se describe en el apartado 2.3). Por un lado, dos dosis de inóculo, 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL. Y por otro lado, dos dosis de inóculo 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL, pero irradiadas durante una hora con luz ultravioleta (UV) en condiciones estériles. Previo a la realización de los inóculos empleados en el experimento, se comprobó que los inóculos tratados con luz UV no eran viables, observando que no había crecimiento al sembrar en placa de agar para métodos estándar tras incubación a 28 °C durante 48 h.

Los inóculos se aplicaron a cada semilla en forma de gota de 10 µL.

Extracción y aplicación de elicitors moleculares de origen bacteriano.

Se extrajeron elicitors moleculares procedentes de N5.18, según el protocolo descrito en Material y Métodos General (apartado 2.3), con peso molecular mayor de 10kDa (NG) y peso molecular menor de 10kDa (NP). Asimismo, se realizó una extracción paralela a partir de caldo nutritivo estéril como control, obteniéndose también dos fracciones con distinto peso molecular (CG y CP). En esta ocasión, los elicitors moleculares se aplicaron a cada semilla en forma de gota de 10 µL, a una concentración de 0,01 mg/mL, en tampón MgSO_4 10 mM. La concentración se seleccionó en base a los resultados obtenidos en el apartado 2.3.

Diseño experimental

El diseño experimental fue el propuesto por Boué et al. (2008), con modificaciones y se resume en la Figura 1.

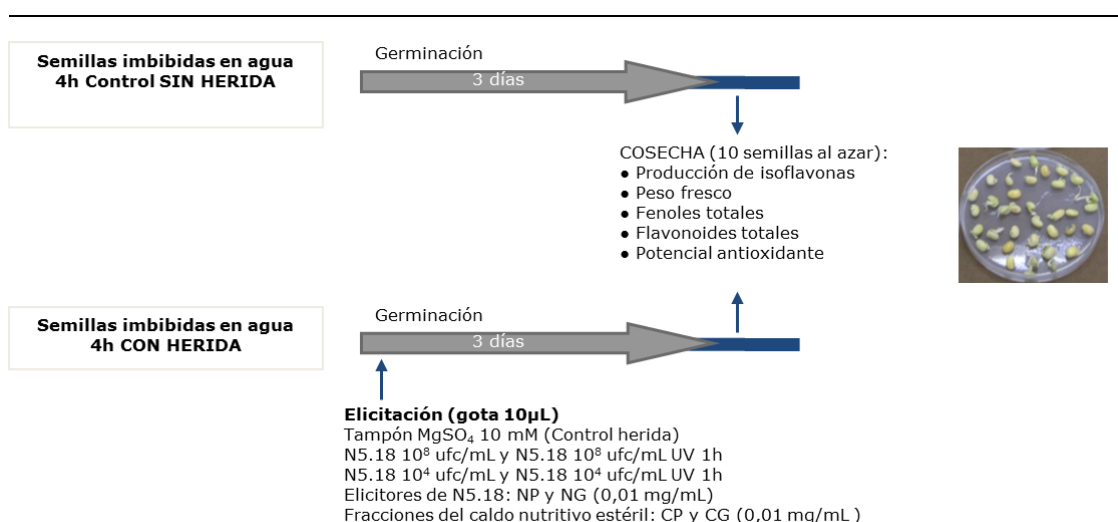


Figura 1. Esquema del experimento realizado con semillas de *Glycine max* cv. Osumi elicidadas con distintas dosis (10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL) de N5.18y de N5.18 irradiada con luz ultravioleta, y con elicitors moleculares liberados al medio por N5.18, con sus respectivos controles.

Se desinfectaron superficialmente semillas de soja según el siguiente protocolo: baño de etanol al 70% en agitación durante 1 minuto, hipoclorito de sodio al 5% durante 6 minutos y 5 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente las semillas se mantuvieron en imbibición en agua destilada estéril durante 4 h, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras las 4 h, se pusieron a germinar 30 semillas/placa en placas Petri (150 mm de diámetro x 20mm de alto) con agar bacteriológico europeo al 1 %. A cada semilla se le realizó un corte longitudinal, pasando por la zona del embrión, donde posteriormente se aplicó una gota de 10 μ L del mismo tratamiento dentro de la misma placa. Una vez aplicado el tratamiento, las placas se mantuvieron durante 3 días en una cámara SANYO MLR-350H a 27 °C y en oscuridad. Cada tratamiento estaba constituido por tres réplicas, siendo cada réplica la unión de 10 semillas crecidas en la misma placa y seleccionadas al azar después de los tres días en la cámara de cultivo.

Se definieron 10 tratamientos, los cuales se especifican a continuación:

- **Control:** semillas sin corte ni tratamiento.
- **Control H:** herida + tampón MgSO_4 10 mM.
- **CG:** herida + 0,01 mg/mL de la fracción de alto peso molecular (**G**) del caldo nutritivo estéril (**C**).
- **CP:** herida + 0,01 mg/mL de la fracción de bajo peso molecular (**P**) del caldo nutritivo estéril (**C**).
- **NG:** herida + 0,01 mg/mL de elicitores de alto peso molecular (**G**) procedentes N5.18 (**N**).
- **NP:** herida + 0,01 mg/mL de elicitores de bajo peso molecular (**P**) procedentes N5.18 (**N**).
- **N 10E8:** herida + 10^8 ufc/mL de N5.18.
- **N 10E8 UV:** herida + 10^8 ufc/mL de N5.18 irradiada con UV.
- **N 10E4:** herida + 10^4 ufc/mL de N5.18.
- **N 10E4 UV:** herida + 10^4 ufc/mL de N5.18 irradiada con UV.

Una vez cosechadas las semillas se determinó el contenido en isoflavonas, fenoles totales, flavonoides totales y potencial antioxidante en el mismo extracto metanólico. Para la obtención de dicho extracto metanólico, se realizó un pulverizado con nitrógeno líquido de las 10 semillas que constituían cada réplica. Posteriormente, a 1 g de cada muestra pulverizada se añadieron 30 mL de metanol al 80%.

Análisis del contenido en isoflavonas

El extracto metanólico obtenido para cada una de las réplicas (n=3) de cada tratamiento (n=10) se utilizó para el análisis del contenido de isoflavonas por HPLC (descrito en Material y Métodos General, apartado 2.5).

La extracción y análisis de isoflavonas se realizó según Wang et al. (2002) y Lozovaya et al. (2004) con modificaciones.

Las muestras se pulverizaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso. Para la extracción de isoflavonas se partió de muestra pulverizada a la cual se añadió metanol al 80% y se mantuvo en un agitador orbital a 145 rpm durante 15 h a 40 °C. Después se centrifugó a 4.500 rpm durante 20 minutos a 20 °C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm, y el extracto metanólico se utilizó para el análisis por HPLC (High-performance liquid chromatography).

La identificación y cuantificación de IF se realizó en un cromatógrafo Beckman equipado con dos bombas 125 Solvent Module y un detector Diodo array 168. Los datos fueron transferidos a un integrador System Gold version 8.10 (Beckman).

Las condiciones de la cromatografía fueron las que se especifican a continuación: detección UV: 262 nm, columna Phenomenex Luna C18 (5 µm, 150mm x 4,6mm), termostatizador Gecko-2000 30-80°C que mantuvo la columna a 30°C. La fase móvil consistió en: solvente A = agua + 0.1% ácido acético, y solvente B = acetonitrilo + 0.1% ácido acético; con el siguiente gradiente: del 15% a 45% de B en 40 minutos y después subió a 100% de B en 1 minuto y se mantuvo en esta composición 9 minutos, tras lo cual descendió a las condiciones iniciales (15 % B) durante 1 minuto y se mantuvo 9 minutos para equilibrar la columna. El flujo fue de 1.5 mL/min y el volumen de inyección de muestra fue de 10 µL.

La cuantificación de las isoflavonas se realizó por interpolación de las cuentas de área relativas dadas por el detector en una recta de calibrado construida para cada principio activo. Las rectas de calibrado fueron construidas con las IF (LC Laboratories): daidzeína, daidzina, genisteína, genistina y malonilgenistina.

Análisis del potencial antioxidante. Ensayo de decoloración del radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•])

Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos metanólicos de cada tratamiento se determinó el grado de decoloración que provocan sus componentes en una solución metanólica del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) según el protocolo descrito por Xu y Chang (2007) con algunas modificaciones.

Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en metanol al 80%. Se mezcló 1 mL de la solución de DPPH 0.1 mM con 100 µL de extracto metanólico. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm (espectrofotómetro UV-Visible Biomate 5). El blanco de referencia fue metanol al 80%.

Los resultados se expresaron como micromoles de Trolox equivalentes por gramo de muestra (µmol TE/g) mediante la construcción de una recta de calibrado usando como antioxidante Trolox (Sigma-Aldrich). El rango de la recta fue 20-250 µM ($r^2 = 0.99$).

Análisis del potencial antioxidante. Ensayo de decoloración de caroteno

Se analizó la capacidad de los extractos metanólicos para evitar la oxidación del β caroteno en el sistema β caroteno/linoleico. En este sistema, se compara el efecto del extracto para prevenir la oxidación del beta caroteno según Matthaus et al (2002). Se prepara una solución de β caroteno (3.34 mg/mL) en cloroformo. A un mL de esta solución se le añaden 400 mg de Tween 20 y 40 mg ácido linoléico. Se evaporan en rotavapor a 40°C. Se resuspende el residuo en 100 mL de agua agitando con fuerza para preparar una emulsión. Se toman 2.5 mL de esta solución de β caroteno/linoleico y se añaden 50 μ L del extracto metanólico. Tras agitar se mide la absorbancia a 470 nm (Abs 0) y se incuba a 40°C durante 2h; se determina la absorbancia a los 30 (Abs 30) y 60 (Abs60) minutos. La actividad antioxidante se calcula como el porcentaje de inhibición (porcentaje de reducción en la tasa de decoloración) relativo al control. El blanco se prepara con la solución de ácido linoléico y Tween 20 sin β caroteno y el control fue una solución con 50 μ L de metanol al 80% en el cual la oxidación del β caroteno fue completa. Se calcula como

$$\% \text{ actividad antioxidante} = [1 - (\text{abs } 0 - \text{abs } 60 \text{ muestra}) / (\text{abs } 0 - \text{abs } 60 \text{ control})] \times 100$$
Análisis del contenido en fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965; Singleton y Lamuela-Raventos, 1999) con modificaciones (Xu y Chang, 2007), usando ácido gálico como patrón.

Se añadieron 3 mL de agua destilada y 250 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich) a 50 μ L de extracto metanólico de semillas. Esta mezcla se agitó y luego se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 750 μ L de Na_2CO_3 al 20% y se volvió a dejar en reposo durante 8 minutos. Por último, se añadieron 950 μ L de agua destilada, se incubó 2 h a temperatura ambiente y oscuridad, y se midió la absorbancia a 760 nm (espectrofotómetro UV-Visible Biomate 5). El blanco de referencia se obtuvo siguiendo el mismo protocolo pero en lugar de 50 μ L de extracto metanólico se añadieron 50 μ L de metanol al 80%.

Se usaron soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich) entre 50-250 μ g/mL para construir la recta de calibrado ($r^2=0.98$). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de semillas.

Análisis del contenido en flavonoides totales

El contenido en flavonoides totales de los extractos metanólicos fue determinado por el método colorimétrico descrito por Zhishen et al. (1999), con modificaciones.

A una alícuota de 1 mL de cada extracto metanólico, se le añadieron 4 mL de agua destilada y 300 μ L NaNO_2 al 5%. Esta mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 300 μ L de AlCl_3 al 10% y se volvió a dejar en reposo durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 2 mL de NaOH y se midió la

absorbancia a 510 nm (espectrofotómetro UV-Visible Biomate 5). El blanco de referencia se obtuvo siguiendo el mismo protocolo pero en lugar de 1 mL de extracto metanólico se añadió 1 mL de metanol al 80%.

Se usaron soluciones de (+)-catequina entre 0 – 100 µg/mL, para construir la recta de calibrado ($r^2=0.99$).

El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de catequina (CAE)/g de muestra.

Análisis estadístico

Se evaluó la influencia del tratamiento sobre los parámetros de crecimiento, producción de isoflavonas, potencial antioxidante, contenido en flavonoides y en fenoles mediante ANOVA unidireccional (Sokal y Rohlf, 1979). Cuando el valor de p era menor que 0,05 (95% de confianza) se consideró que existían diferencias significativas atribuibles al tratamiento. En este caso, se compararon los valores medios mediante el estadístico LSD (Least Significant Difference) de Fisher. El programa utilizado fue el STATGRAPHICS Plus 5.1, según se ha descrito en Material y Métodos General (apartado 2.8).

Resultados

Análisis del contenido en isoflavonas

En primer lugar, se determinó si el estrés inducido por el corte de la semilla alteraba los contenidos de isoflavonas o de alguna de las familias. Al comparar los contenidos en isoflavonas entre los controles con y sin herida se comprobó que en ningún caso hubo diferencias significativas (Tabla 1) por lo que se trataron los resultados posteriores sin incluir este tratamiento.

Tabla 1. Concentración de isoflavonas (mg/g) de cada familia e isoflavonas totales en semillas pregerminadas de 3 días control y control con herida (Control H). Los datos son la media \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

	<i>Familia</i> <i>Daidzeína(mg/g)</i>	<i>Familia</i> <i>Genisteína (mg/g)</i>	<i>Total (mg/g)</i>
Control	0,358 \pm 0,019 a	0,447 \pm 0,020 a	0,806 \pm 0,039 a
Control H	0,378 \pm 0,016 a	0,510 \pm 0,017 a	0,888 \pm 0,032 a

Las especies mayoritarias de IF en semillas pre-germinadas de soja de 3 días eran las malonilconjugadas, seguidas por las glicosiladas y por último por las agliconas (tabla 2). En cuanto a la concentración de las distintas familias de isoflavonas, la más abundante fue la de la genisteína, seguida de la familia de la daidzeína (tabla 2).

Tabla 2. Concentración de cada una de las isoflavonas analizadas (mg/g) en semillas pregerminadas de 3 días control y control con herida (Control H). Los datos son la media \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada isoflavona de forma independiente ($p < 0,05$).

	<i>Daidzina</i> (mg/g)	<i>Malonildaidzina</i> (mg/g)	<i>Daidzeína</i> (mg/g)	<i>Genistina</i> (mg/g)	<i>Malonilgenistina</i> (mg/g)	<i>Genisteína</i> (mg/g)
Control	0,105 \pm 0,007 a	0,211 \pm 0,012 a	0,043 \pm 0,001 a	0,117 \pm 0,006 a	0,330 \pm 0,014 a	0,000 \pm 0,000 a
Control	0,122 \pm	0,229 \pm	0,028 \pm	0,136 \pm	0,374 \pm	0,000 \pm
H	0,005 a	0,009 a	0,002 b	0,003 a	0,014 a	0,000 a

Una vez descartado el posible efecto derivado del estrés traumático inducido por el corte, se analizó el peso de los diferentes lotes de semillas al final del experimento y se comprobó que no había diferencias significativas entre las semillas con herida y sin herida, ni bajo los efectos de los distintos tratamientos. (Figura 2).

Como se observa en la Figura 3.a, cuando se aplicó la cepa N5.18 a una dosis de 10^8 ufc/mL no se producen cambios en las IF totales, aunque la misma dosis irradiada con luz UV, provoca aumentos significativos de las isoflavonas totales (+28%), que afecta ambas familias (+ 21% y +36%, genisteína y daidzeína, respectivamente). Cuando se aplicó la cepa a dosis más bajas, se detecta el mismo efecto en IF totales, tanto con la cepa viva (+18%) como tratada con luz UV (+16%). Por otra parte, los elicitores moleculares (estructurales) de la cepa no tuvieron efecto, puesto que se encontraron incrementos inespecíficos bajo el efecto de los elicitores control (Figura 3.b).

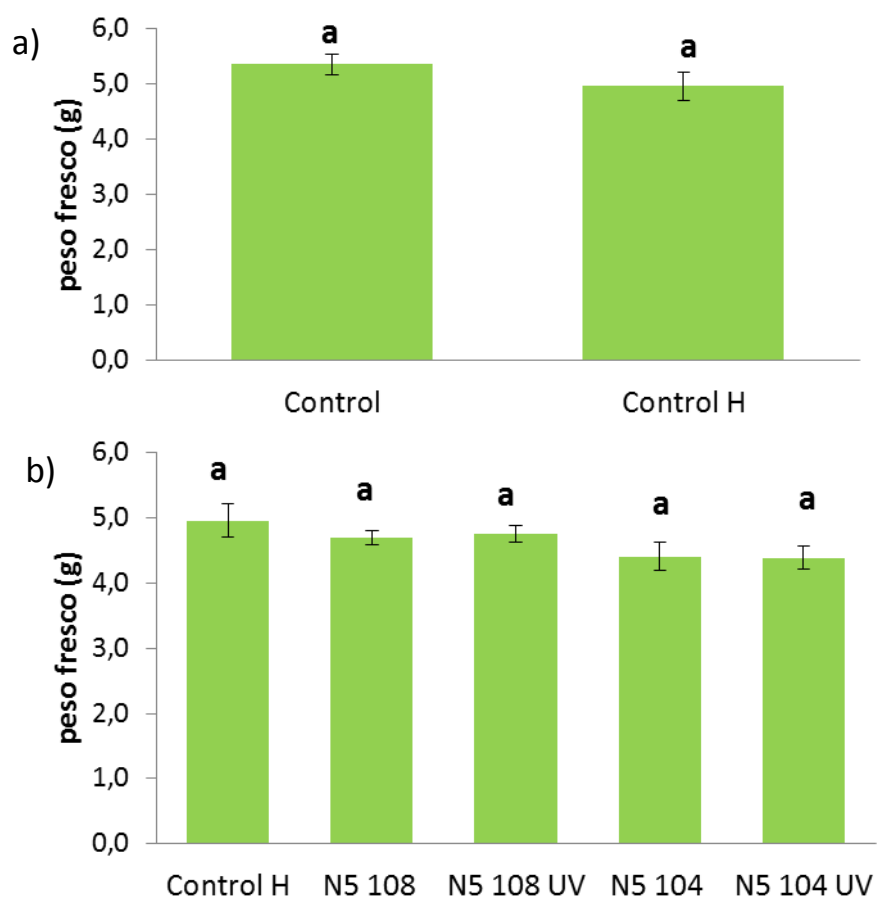


Figura 2. Peso fresco (g) de lotes de 10 semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos:

a) Control sin herida (Control) y control con herida (Control H).

b) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 108 ufc/mL y 104 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 10E8 UV y N5 10E4 UV) y sin irradiar (N5 10E8 y N5 10E4).

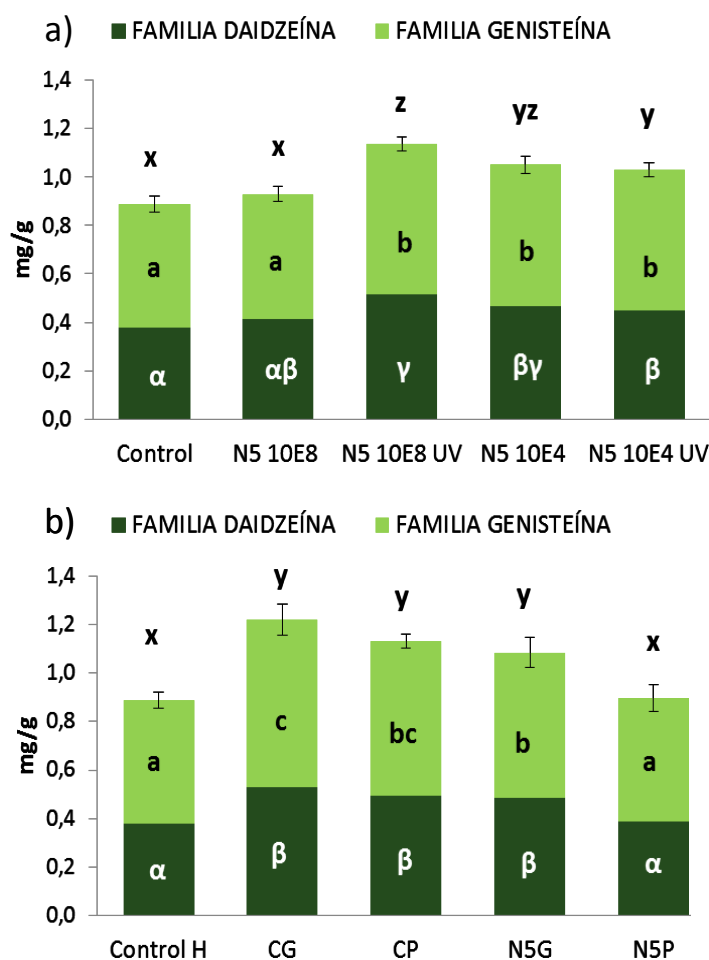


Figura 3. Concentración de isoflavonas totales y de cada familia (mg/g) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos:

a) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 108 UV y N5 104 UV) y sin irradiar (N5 108 y N5 104).

b) Control con herida (Control H), fracciones del caldo nutritivo estéril (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (N5G y N5P).

Los datos son la media \pm error estándar ($n=3$). El error estándar que aparece en la figura corresponde al de las isoflavonas totales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (X,Y,Z) para isoflavonas totales, (α,β,γ) para la familia de la genisteína y (a,b,c) para la familia de la daidzeína ($p < 0,05$).

A continuación se analizaron los resultados correspondientes al contenido de cada una de las especies químicas de isoflavonas de forma independiente. Como ya se ha indicado, se descartó que los efectos se debieran al estrés traumático inducido por el corte (Tabla 2).

En el caso de los tratamiento con bacterias, en la familia de la Daizeina aumentan tanto los aglicones como los malonil derivados, mientras que en la familia de la Genisteína aumentan las tres especies (Tabla

3.a). Por otra parte, el efecto de los elicitores moleculares sobre las IF totales se mantenía sobre las distintas especies de IF (Tabla 3.b), tanto si proceden de bacterias como del medio del cultivo, es decir, los efectos se deben a determinantes inespecíficos del medio de cultivo.

Tabla 3.a. Concentración de cada una de las isoflavonas analizadas (mg/g) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 10E8 UV y N5 10E4 UV) y sin irradiar (N5 10E8 y N5 10E4). Los datos son la media \pm error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada isoflavona de forma independiente ($p < 0,05$).

	<i>Daidzina</i> (mg/g)	<i>Malonildaidzina</i> (mg/g)	<i>Daidzeína</i> (mg/g)	<i>Genistina</i> (mg/g)	<i>Malonilgenistina</i> (mg/g)	<i>Genisteína</i> (mg/g)
Control	0,122 \pm	0,229 \pm	0,028 \pm	0,136 \pm	0,374 \pm	0,000 \pm
	0,005 a	0,009 a	0,002 a	0,003 a	0,014 a	0,000 a
N5 10E8	0,132 \pm	0,235 \pm	0,045 \pm	0,151 \pm	0,362 \pm	0,006 \pm
	0,010 a	0,007 a	0,02 b	0,005 b	0,010 a	0,001 b
N5 10E8	0,162 \pm	0,303 \pm	0,049 \pm	0,179 \pm	0,436 \pm	0,006 \pm
UV	0,014 a	0,013 c	0,002 bc	0,003 c	0,011 b	0,001 b
N 10E4	0,143 \pm	0,275 \pm	0,047 \pm	0,151 \pm	0,433 \pm	0,001 \pm
	0,013 a	0,020 bc	0,004 bc	0,003 b	0,009 b	0,001 a
N5 10E4	0,141 \pm	0,258 \pm	0,053 \pm	0,161 \pm	0,413 \pm	0,005 \pm
UV	0,006 a	0,009 ab	0,003 c	0,005 b	0,009 b	0,001 b

Tabla 3.b. Concentración de cada una de las isoflavonas analizadas (mg/g) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: control con herida (Control H), elicitores moleculares procedentes del medio de cultivo libre de bacteria (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (N5G y N5P). Los datos son la media \pm error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada isoflavona de forma independiente ($p < 0,05$).

	<i>Daidzina</i> (mg/g)	<i>Malonildaidzina</i> (mg/g)	<i>Daidzeína</i> (mg/g)	<i>Genistina</i> (mg/g)	<i>Malonilgenistina</i> (mg/g)	<i>Genisteína</i> (mg/g)
Control	0,122 \pm 0,005 a	0,229 \pm 0,009 a	0,028 \pm 0,002 ab	0,136 \pm 0,003 a	0,374 \pm 0,014 ab	0,000 \pm 0,000 a
CG	0,178 \pm 0,013 b	0,299 \pm 0,026 a	0,052 \pm 0,002 c	0,198 \pm 0,013 c	0,489 \pm 0,013 c	0,005 \pm 0,001 b
CP	0,166 \pm 0,006 b	0,294 \pm 0,010 a	0,034 \pm 0,002 b	0,179 \pm 0,012 c	0,452 \pm 0,010 cd	0,008 \pm 0,001 c
N5G	0,160 \pm 0,011 b	0,293 \pm 0,021 a	0,034 \pm 0,003 b	0,172 \pm 0,015 bc	0,422 \pm 0,013 bc	0,004 \pm 0,001 b
N5P	0,130 \pm 0,007 a	0,233 \pm 0,015 b	0,025 \pm 0,002 a	0,140 \pm 0,008 ab	0,369 \pm 0,024 a	0,000 \pm 0,000 a

Potencial antioxidante, contenido en fenoles totales y en flavonoides totales

Se realiza un control previo para comprobar el efecto del estrés traumático inducido por el corte sobre los parámetros estudiados. Como en casos anteriores, la herida no afecta de forma significativa al potencial antioxidante, al contenido en fenoles totales ni a flavonoides totales (Tabla 4), aunque si se aprecia un aumento de todos los parámetros.

Tabla 4. Potencial antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$), fenoles totales (mg GAE/g) y flavonoides totales (mg CAE/g) en semillas pregerminadas de 3 días control y control con herida (Control H). Los datos son la media \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

	<i>Potencial antioxidante</i> ($\mu\text{mol TE/g}$)	<i>Fenoles totales</i> (mg GAE/g)	<i>Flavonoides totales</i> (mg CAE/g)
Control	1,226 \pm 0,148 a	2,762 \pm 0,140 a	0,265 \pm 0,023 a
Control H	1,684 \pm 0,078 a	3,002 \pm 0,174 a	0,280 \pm 0,018 a

El efecto de los distintos tratamientos sobre el potencial antioxidante se resume en las Figuras 4 y 5. Ningún tratamiento aumentó el potencial antioxidante de las semillas, en cambio, sí se detectaron disminuciones significativas de dicho potencial con el tratamiento N5.18 10E8 vivas (Figura 4.a).

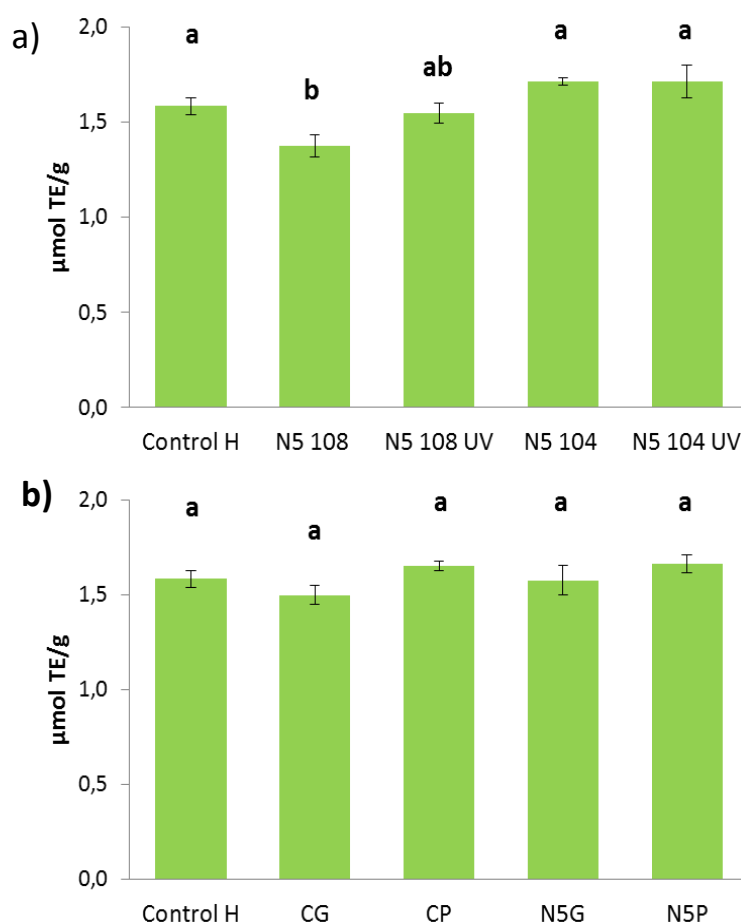


Figura 4. Potencial antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: a) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 10E8 UV y N5 10E4 UV) y sin irradiar (N5 10E8 y N5 10E4). b) Control con herida (Control H), fracciones del caldo nutritivo estéril (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (N5G y N5P). Los datos son la media \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los extractos de las semillas inoculadas con N5.18 vivas y muertas a ambas concentraciones mostraron un potencial antioxidante mayor que las semillas control (figura 5.a) mientras que sólo los elicitores metabólicos pequeños produjeron un incremento del potencial antioxidante significativamente superior al control.

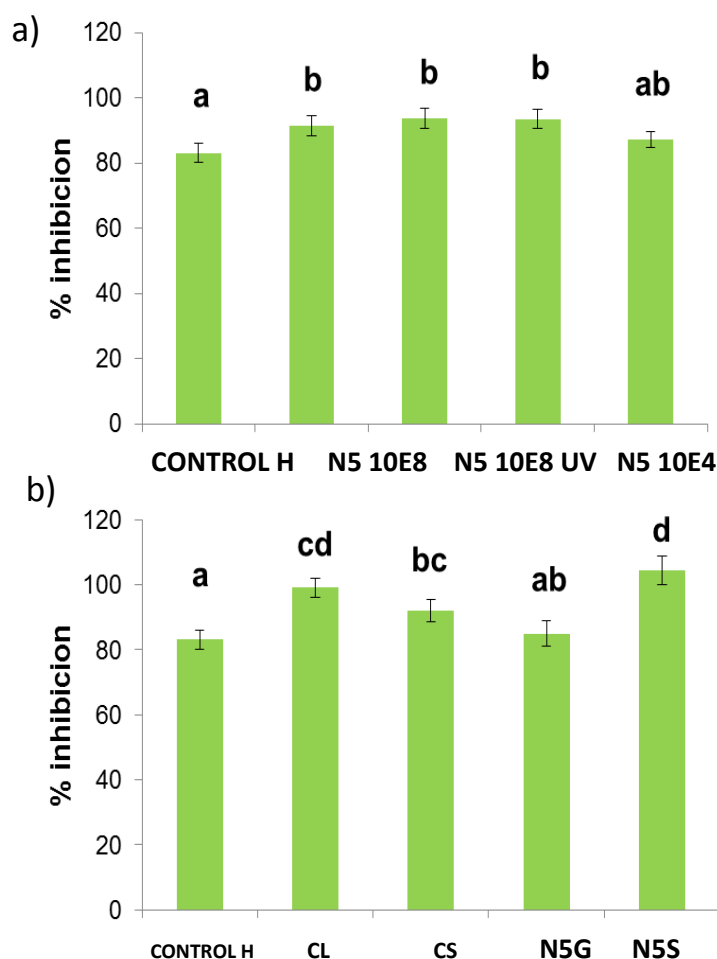


Figura 5. Potencial antioxidante % inhibición de la oxidación de β caroteno en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: a) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 10E8 UV y N5 10E4 UV) y sin irradiar (N5 10E8 y N5 10E4). b) Control con herida (Control H), fracciones del caldo nutritivo estéril (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (N5G y N5P). Los datos son la media \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Al analizar los resultados del contenido en fenoles totales (Figura 6) se observó que todos los tratamientos bacterianos incrementaron de forma significativa el contenido en fenoles totales con respecto al control, siendo especialmente eficiente la cepa inactivada con UV en menor concentración que produce un incremento de un 56%, mientras que los incrementos de los otros tratamientos oscilaban entre un 16% y un 28% (Figura 6.a). Los elicitores moleculares tienen un efecto similar al descrito para las IF.

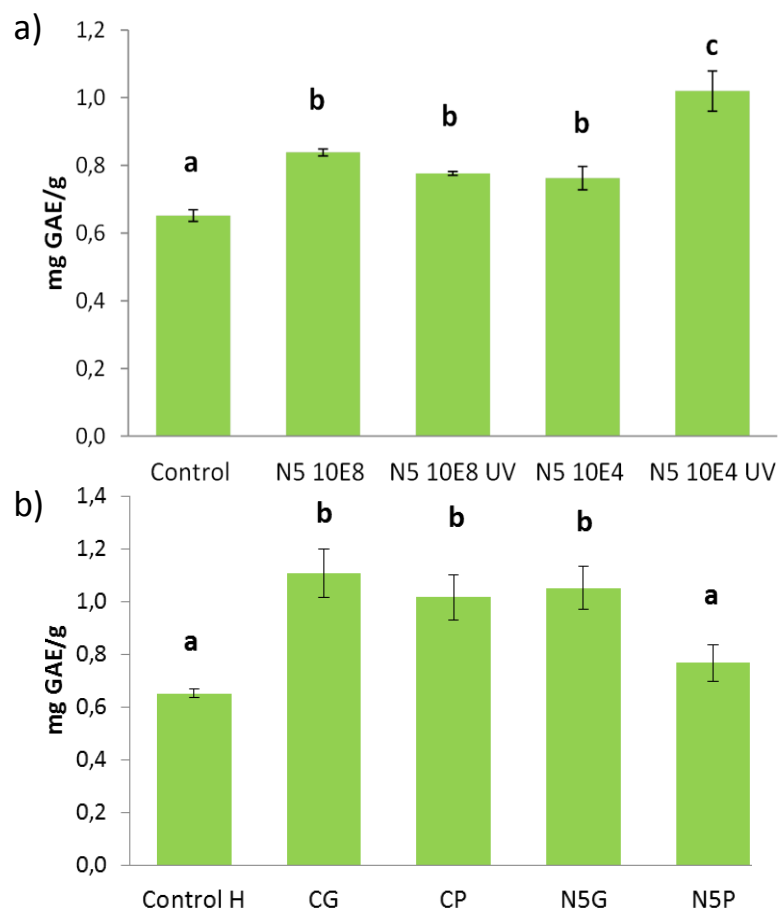


Figura 6. Fenoles totales (mg GAE/g) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: a) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N5 10E8 UV y N5 10E4 UV) y sin irradiar (N5 10E8 y N5 10E4). b) Control con herida (Control H), fracciones del caldo nutritivo estéril (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (N5G y N5P). Los datos son la media \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Por otra parte, solo N5 10E4 incrementó el contenido en flavonoides totales de forma significativa (Figura 7.a, mientras que los elicitores moleculares bacterianos no tuvieron efecto. (Figura 7.b).

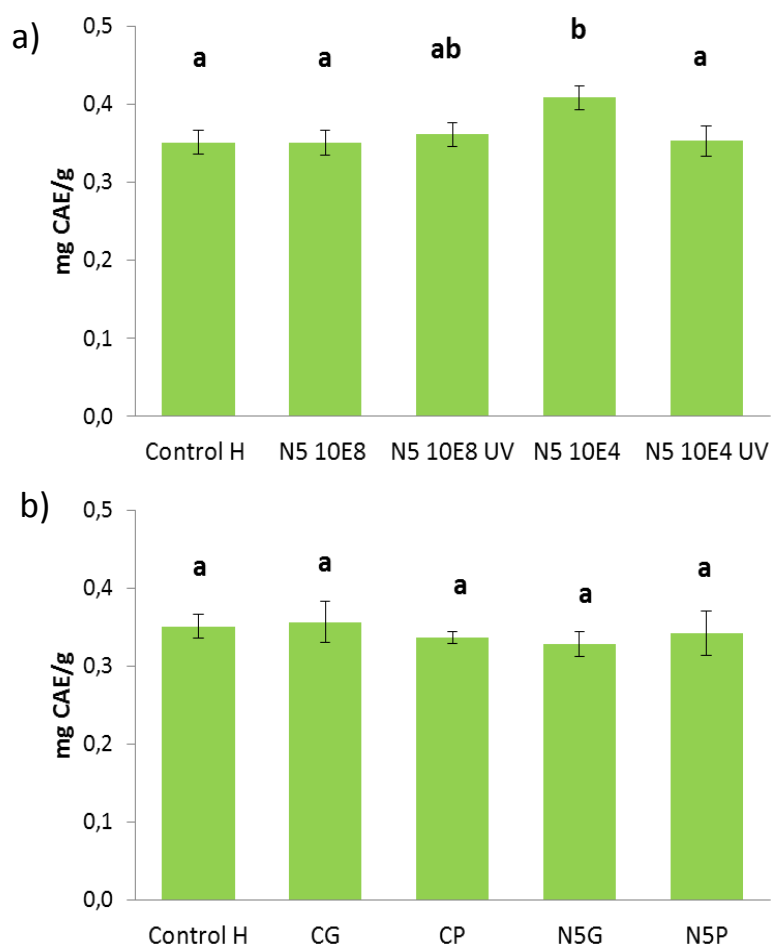


Figura 7. Flavonoides totales (mg CAE/g) en semillas pregerminadas de 3 días bajo los siguientes tratamientos: a) Control con herida (Control H), cepa bacteriana N5.18 en densidades 10^8 ufc/mL y 10^4 ufc/mL irradiadas con luz UV (N 10E8 UV y N 10E4 UV) y sin irradiar (N 10E8 y N 10E4). b) Control con herida (Control H), fracciones del caldo nutritivo estéril (CG y CP) y elicitores moleculares procedentes del medio en el que creció N5.18 (NG y NP). Los datos son la media \pm error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Discusión

Los alimentos funcionales están cobrando cada vez mayor importancia en la alimentación de la sociedad moderna, donde el mayor esfuerzo se empieza a plantear en prevenir la aparición de enfermedades degenerativas de elevado coste social. Los experimentos desarrollados en este estudio se dirigen hacia sistemas biotecnológicos orientados a la obtención de alimentos funcionales. Concretamente el objetivo fundamental es conseguir una materia prima con un contenido en IF mejorado.

La elección de elicitores de origen bacteriano está apoyada por la literatura, sin embargo, la aplicación directa de la bacteria en un producto de consumo humano requiere una cautelosa evaluación de la toxicidad potencial, ya que, aunque la cepa bacteriana se ha aislado de ecosistemas naturales y no ha sufrido ninguna modificación genética, sí existen cepas bacterianas aisladas de rizosferas que pueden desencadenar enfermedades en humanos por ejemplo cepas bacterianas del género *Pseudomonas*, *P. fluorescens*, en las que se ha descrito una posible capacidad patogénica de carácter oportunista (Picot et al., 2001; Madi et al., 2010). Con respecto a la literatura sobre *Stenotrophomonas maltophilia*, se ha encontrado que su gran capacidad de adaptación también se refleja en su capacidad para participar en procesos de biorremediación, y por ser un patógeno oportunista (Considerando este riesgo, y sobre la base de los resultados obtenidos en el capítulo anterior (efecto de elicitores moleculares de origen bacteriano sobre cultivos de células diferenciadas), se plantea el uso de la elicitación con efectores metabólicos y/o MAMPs procedentes de la cepa bacteriana N5.18 como alternativa al uso directo de la cepa.

El proceso biotecnológico aquí diseñado implica realizar una incisión en la semilla para asegurar el contacto del elicitor con las células vegetales. La realización de esta incisión podría representar un factor de estrés que podría causar un aumento en las IF dado su papel en situaciones de estrés (Al-Tawaha et al., 2005; Yu y McGonigle, 2005; Boué et al., 2008). Sin embargo, esta posibilidad queda descartada a la vista de los resultados ya que en ningún caso aparecen diferencias significativas, en ninguno de los parámetros evaluados, comparando semillas sin herida con las semillas con herida (Tablas 1, 2 y 4).

Una vez definida la forma de aplicación del elicitor pasamos a analizar los efectos de los distintos tratamientos. Si bien los tratamientos bacterianos sí alteraron el metabolismo secundario de las semillas (fenoles totales, flavonoides totales e IF), los tratamientos con los elicitores metabólicos no lo hicieron.

En primer lugar, los tratamientos bacterianos incrementaron de forma significativa el contenido en fenoles totales, siendo el tratamiento más eficiente el de 10E4 inactivado con luz UV. El incremento en fenoles totales en respuesta al tratamiento con elicitores bióticos ya se ha demostrado anteriormente (Boué et al 2008) asociados a un incremento en el potencial antioxidante, si bien estos estudios se realizan con elicitores bióticos procedentes de un patógeno. En nuestro caso encontramos un incremento del potencial antioxidante asociado al aumento de fenoles totales cuando se determina mediante el método del B-

caroteno, coincidiendo por lo tanto con los resultados de Boué et al. (2008). Asumiendo que la bacteria permanece viva durante el periodo de elicitación, podemos sugerir un efecto bien de moléculas de superficie (MAMPs), o bien de moléculas resultantes del metabolismo bacteriano liberadas al medio (efectores o MAMPs), a través de los cuales interacciona con las células vegetales.

El incremento detectado en los fenoles totales (figura 6) no se refleja en los flavonoides totales, en los que sólo produce un incremento significativo la cepa a bajas dosis pero viable (figura 7, y sin embargo, sí se detecta un incremento en IF totales con todos los tratamientos salvo N5 10E8 viable (figura 3). La modificación diferencial de los marcadores utilizados indica que los MAMPs de N5.18 están induciendo la ruta del ácido sikimico en diferentes puntos de la misma; el incremento en fenoles totales sugiere una diana en puntos muy iniciales dentro de esta ruta ya que es un incremento general de compuestos fenólicos. El incremento limitado en flavonoides totales acompañado de un incremento en IF totales y modificación de las especies químicas de ambas familias de IF indica que la ruta se desvía a compuestos defensivos de tipo isoflavona, que actuarían como fitoalexinas, siendo los flavonoides las fitoanticipinas (Boue et al 2009; Capanoglu 2010; García-Seco et al 2012).

En este sentido, y como ya hemos comentado con respecto a los tratamientos realizados con la bacteria, la dosis de 10^8 ufc/mL viables (N510E8) no produce cambios significativos ni en IF totales (figura 3) mientras que la misma dosis inactivada con UV, y los dos tratamientos en menor concentración sí producen cambios. Los incrementos en IF son más acusados con la cepa inactivada a mayor concentración, aunque no existen diferencias significativas con los tratamientos a menor concentración. Este comportamiento diferencial sugiere que el efecto está mediado por receptores PRRs (pathogen- or microbe- recognition receptors) (Erbs and Newman, 2012). Los determinantes bacterianos (MAMPs) implicados en el reconocimiento de estos receptores son de distinta naturaleza y pueden actuar en concentraciones muy variables de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Newman et al 1995; Ramos Solano et al 2008). Este rango de concentraciones tan amplio se debe en parte a los sistemas de baja afinidad de las plantas para detectar MAMPs de tipo LPS (Zeidler et al 2004) y a la capacidad de agregación de los LPS por su naturaleza anfipática (Aslam et al 2009), lo que les hace perder su efecto como ocurre en el caso de 10E8 viva. Puesto que la naturaleza de los determinantes bacterianos (MAMPs) de N5.18 no está definida no se puede descartar que sean de tipo LPS por su naturaleza de gram negativa. Por otra parte, parece que se trata de determinantes estructurales, pues encontramos efecto tanto cuando se aplican cepas vivas como inactivadas con UV. Se pueden descartar que el efecto sea debido a productos del metabolismo liberados al medio cuando la cepa está viva, ya que no se observa efecto de los elicitores metabólicos (metabolitos liberados al medio y eliminadas las células bacterianas).

El hecho de que haya cambios en las especies químicas de IF confirma que ha habido una respuesta, y que se ha alcanzado el umbral necesario para aumentar las isoflavonas totales. Teniendo en cuenta la interconversión de las distintas especies (conjugado-aglicón), un aumento de la concentración del aglicón

asociado a una disminución en los conjugados, eliminaría la posibilidad de una síntesis *de novo*, y por el contrario el aumento del aglicón manteniendo los niveles de conjugados constantes o aumentados sugiere una síntesis *de novo*. Esta hipótesis se confirma con nuestros resultados ya que se demuestra que las IF aumentan debido a un aumento en los aglicones y en los malonílderivados, que son las principales formas de acumulación (Mackenbrock et al., 1992). Podemos concluir al respecto que existe una clara respuesta muy probablemente debida a factores de elicitación relacionados con moléculas de superficie, como LPS, ya citados como elicitores en otras bacterias Gram negativas como por ejemplo *Chryseobacterium balustinum* Aur9 (Ramos Solano et al., 2008).

La elicitación de semillas se plantea con el doble objetivo de aumentar la concentración de IF y comprobar su relación con el potencial antioxidante (Boué et al., 2009). Los fenoles totales y en particular los flavonoides contribuyen en gran medida al potencial antioxidante de materias primas de origen vegetal (Xu y Chang, 2008; Paredes-López et al., 2010). En nuestro caso la elicitación con bacterias (N10E8) es capaz de producir un aumento en las IF totales (Figura 3) y en fenoles totales (Figura 6) y sin embargo, apenas se ven afectados los flavonoides totales (Figura 7). Los resultados de potencial antioxidante valorados como la capacidad de captar radicales libres (Figura 4) no mejoran con la elicitación, sino que incluso disminuye. Sin embargo, al valorar el potencial de inhibición de la oxidación de β caroteno, sí mejora con los tratamientos (figura 5), lo que indica una mayor capacidad de protección en sistemas biológicos. Según Xu y Chang (2008) tras evaluar 30 variedades de soja concluyen que el potencial antioxidante de los extractos procedentes de semillas depende fundamentalmente del contenido total de fenoles, no atribuyendo a las concentraciones de isoflavonas un papel fundamental en el potencial antioxidante. Sin embargo, Boué et al (2008) encuentran una relación directa entre los fenoles totales y el potencial antioxidante y entre IF y potencial antioxidante con ambos métodos de análisis. Nuestros resultados indican que los tratamientos empleados en elicitación alteran la cantidad total de fenoles y estos resultados se correlacionan con los potenciales antioxidantes obtenidos. Según Zhishen et al. (1999) la capacidad para capturar radicales libres por parte de este grupo depende de la posición y grado de hidroxilación de los mismos, por lo que podemos señalar que la modificación en el tipo de flavonoides no hace referencia a tipos eficaces en cuanto a su capacidad de captura de radicales libres.

Por lo tanto, desde el punto de vista aplicado al alimento funcional, los brotes de soja elicitados de esta forma proporcionarían un aporte de IF y las mejoras sobre la salud asociadas estrictamente al consumo de IF, descartándose los beneficios generalistas asociados a su potencial antioxidante. Una vez demostrada la capacidad de elicitación de los MAMPs procedentes de N5.18, sería necesario caracterizarlas y aislarlas para obtener niveles de IF reproducibles.

Conclusiones

- Los elicitores metabólicos aislados del medio de cultivo de N5.18, NP y NG, no tienen efecto sobre la semilla en la concentración ensayada.
- La aplicación de la cepa bacteriana tanto en su forma viable como no viable sí es efectiva en la estimulación del metabolismo de IF, aunque en cada caso la dosis efectiva es diferente.
- Los determinantes responsables de la estimulación del metabolismo de isoflavonas en semillas pregerminadas de soja deben ser moléculas estructurales de superficie.
- Si existe una relación entre la concentración de IF y el potencial antioxidante medido como prevención de la oxidación del β -Caroteno

Bibliografía

Al-Tawaha, A. M., Seguin, P., Smith, D. L., Beaulieu, C. 2005. Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. *Ann Appl Biol*, 146: 303–310.

Alves, H.S., da Silva, R., Macagnan, D., de Almeida, B., Barakat, M.C., Mounteer, A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol Control*, 29: 288-295.

Aslam, S.N., Erbs, G., Morrissey, K.L., Newman, M.-A., Chinchilla, D., Boller, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Cooper, R.M. 2009. MAMPs signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. *Mol. Plant Pathol*, 10: 375–387.

Bennett, J.O., Yu, O., Heatherly, L.G., Krishnan, H.B. 2004. Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health is significantly elevated by irrigation. *J Agr Food Chem*, 52: 7574-7479.

Berger, M., Rasolohery, C.A., Cazalis, R., Daydé, R. 2008. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. *Crop Sci*, 48: 700-708.

Boué, S.M., Cleveland, T.E., Carter-Wientjes, C., Shih, B.Y., Bhatnagar, D., McLachlan, J.M., Burow, M.E. 2009. Phytoalexin-enriched functional foods. *J Agr Food Chem*, 57: 2614–2622.

Boué, S.M., Shih, F.F., Shih, B.Y., Daigle, K.W., Carter-Wientjes, C.H., Cleveland, T.E. 2008. Effect of biotic elicitors on enrichment of antioxidant properties and induced isoflavones in soybean. *J Food Sci*, 73 (4): 43-49.

Capanoglu, E. 2010. The potential of priming in food production. *Trends Food Sci Technol*, 21(8): 399-407.

Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dye, F., Bertrand, C., Prigent-Combaret, C. 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87: 65-77

Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7 (5): 210-216.

Erbs, G., Newman, M.A. 2011. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol*, 13(1): 95-104.

EUROPA - The official website of the European Union. 2011. Food Safety- From the Farm to the Fork (http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index_en.htm).

García-Seco, D., Bonilla, A., Algar, E., García-Villaraco, A., Mañero, J., Ramos-Solano, B., 2013. Enhanced blackberry production using *Pseudomonas fluorescens* as elicitor. *Agron Sustain Dev*, 33: 385-392.

Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A., Barrientos Casero, M.L. 2003. Systemic induction of terpenic compounds in *D. lanata*. *J Plant Physiol*, 160: 105-130.

Isanga, J., Zhang, G. 2008. Soybean bioactive components and their implications to health—A Review. *Food Rev Int*, 24: 252–276.

Kim, S., Jung, W., Ahn, J., Kim, J., Chung, I. 2005. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO₂ level and N application. *J Sci Food Agr*, 85: 2557–2566.

Lozovaya, V.V., Lygin, A.V., Zernova, O.V., Li, S., Hartman, G.L., Widholm, J.M. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiol Biochem*, 42: 671-679.

Mackenbrock, U., Vogelsang, R., Barz, W. 1992. Isoflavone and pterocarpan malonylglucosides and β -1,3-glucan- and chitin- hydrolases are vacuolar constituents in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Z. Naturforsch* 47c: 815-822.

Madi, A., Svinareff, P., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Connil, N. 2010. *Pseudomonas fluorescens* alters epithelial permeability and translocates across Caco-2/TC7 intestinal cells. *Gut Pathog*, 2:16.

McCue, P., Shetty, K. 2004. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement. *Crit Rev Food Sci*, 44: 361-367.

Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J Agric Food Chem* 50:3444-3452

Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck- Reichhart, D., Ausubel, F.M. 2010. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 22: 973–990.

NBJ. 2010. NBJ's Nutritional Raw Material & Ingredient Supply Report (<http://www.nutritionbusinessjournal.com>).

Newman, M.-A., Daniels, M.J., Dow, J.M. 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defence-related gene expression in *Brassica campestris*. Mol Plant-Microbe Interact, 8: 778–780.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., Hernández-Pérez, T. 2010. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life—A Review. Plant Foods Hum Nutr, 65:299–308.

Picot, L., Abdelmoula, S.M., Merieau, A., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., Feuilloley, M.G. 2001. *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. Microbes Infect, 3: 985-995.

Pilšáková, L., Riečanský, I., Jagla, F. 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. Physiol Res, 59: 651-664.

Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B., Kneer, R., Cragg, G.M., Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. J Med Chem, 46 (12): 2542-2547.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavaraz, T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol Appl Biochem, 37: 91-102.

Ramos Solano, B., Algar, E., García-Villaraco, A., García Cristóbal, J., Lucas García, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2010. Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. Osumi. J Agr Food Chem, 58: 1484–1492.

Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M.T., Domenech, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2008. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection and biotic elicitors. Phytopathology, 98 (4): 451-457.

Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Aroldi, C., Vazzana, C., Heimler, D. 2003. Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions. J Agr Food Chem, 51: 5301-5306.

Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D., Dow, J.M., 2009. Nature Reviews Microbiology, 7: 514-525.

Singleton, V.L., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299: 152–178.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult, 16: 144–158.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1979. Biometría: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. Lahoz, M. (Trad.). H. Blume Ediciones. Madrid, España. 832 p.

van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Corné, M.J.P., Ton, J. 2006. Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 5602-5607.

van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36:453-483.

Watanabe, S., Uesugi, S., Kikuchi, Y. 2002. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomed Pharmacother*, 56: 302–312.

Wegulo, S.N., Yang, X., Martinson, C.A., Murphy, P.A. 2005. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. *Can J Plant Sci*, 85: 749-760.

Xu, B.J., Chang, S.K.C. 2008. Characterization of phenolic substances and antioxidant properties of food soybeans grown in the north Dakota-Minnesota region. *J Agr Food Chem*, 56: 9102–9113.

Xu, B.J., Chang, S.K.C., 2007. Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci*, 72 (2): 159-166.

Yu, O., McGonigle, B. 2005. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Adv Agron*, 86:147-190.

Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hertung, T., Bors, W., Hutzler, P. Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana* lipopolysaccharides activates nitric oxide synthase NOS and induces defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 15811–15816.

Zhang, S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. 2004. Tobacco growth enhancement and blue mold protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. *Plant Soil*, 262: 277-288.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4): 555-559.

Capítulo 3. Discusión general

El planteamiento de esta memoria se basa en la hipótesis del papel fundamental que el sistema microbiano asociado al sistema radical de las plantas tiene sobre el metabolismo vegetal y las consiguientes aplicaciones de los productos derivados del mismo. Este sistema rizosférico microbiano, el microbioma rizosférico (Berendsen, 2012), cumple un papel fundamental para que la planta consiga mejorar sus capacidades de adaptación a un ambiente cambiante, que impone condiciones muy variables y con frecuencia estresantes.

Los apartados que constituyen el capítulo 2 de este trabajo se exponen de manera enlazada basándose en hipótesis sucesivas que pretenden evidenciar el potencial de aplicación de las bacterias asociadas a la planta y los distintos enfoques de aplicación biotecnológicos.

En primer lugar, apartado 2.1, se plantea el uso de la rizosfera como fuente de microorganismos especialmente adaptados a la interacción del sistema planta/microorganismos. Un sistema en el que la presión selectiva definida por la planta condiciona el tipo de microorganismos (Marilley y Aragno, 1999, Lucas García et al., 2001, Garbeva, 2004, Barriuso et al., 2005 Hartmann, 2009, Mavrodi, 2012), su diversidad y en definitiva la estructura de las comunidades microbianas que se desarrollan en este ecosistema. Sobre la hipótesis de la capacidad de selección de microorganismos por la planta, primero se busca una planta que aporte una serie de factores de presión-selección que, a priori, puedan resultar de interés para la posterior aplicación específica de las cepas seleccionadas. La planta se elige en base a criterios filogenéticos y metabólicos. Por una parte la planta, *Nicotiana glauca*, es una Solanacea, originaria de America del Sur. Se trata de una planta de carácter invasivo, con una enorme capacidad de adaptación a ambientes secos, gran fortaleza para colonizar suelos pobres y resistir el ataque de agentes patógenos causantes de fuertes daños en otras plantas de la misma familia con gran interés alimentario, como el tomate, *Solanum lycopersicum*, la patata, *Solanum tuberosum* o el pimiento, *Capsicum annum*. Por otra parte se trata de una planta con un metabolismo secundario muy activo, *Nicotiana glauca* presenta una amplia variedad de alcaloides piridínicos, entre los que se ha encontrado como mayoritario anabasina, que aparece en todos los órganos de la planta. Además se han encontrado anatabina, nicotina, nor-nicotina, N'-nor-anabasina, 2-3 bipiridina, cotinina, miosmina, nicotelina, óxido de nicotina, ácido nicotínico y 3-acetil-piridína. La anabasina tiene potentes efectos farmacológicos, fundamentalmente basados en la estimulación ganglional seguida de desensibilización de los receptores y bloqueo de la transmisión nerviosa. Pero además extractos de esta planta han demostrado un fuerte efecto insecticida, antimicrobiano.(Tomizawa y Casida, 2011; Forrester, 2014). Por las razones expuestas, previsible capacidad de selección microbiana, características de la planta, y proximidad filogenética a plantas de interés agroalimentario, se selecciona esta planta como sujeto de muestreo rizosférico, en busca de un microbioma cultivable y con aplicaciones por sus aportaciones beneficiosas en la interacción.

La búsqueda de cepas con efectos sobre la planta, se realiza sobre un secreening a gran escala en el que se intenta absorber la máxima variabilidad genética de los microorganismos que se desarrollan en el sistema rizosférico de *Nicotiana glauca*. Posteriormente se realizan las pruebas necesarias para detectar cepas capaces de mejorar de alguna manera la capacidad adaptativa de plantas filogenéticamente relacionadas con *Nicotiana glauca*, como *Solanum lycopersicum*, fundamentalmente en cuanto a su capacidad de crecimiento y resistencia a factores de estrés como el ataque de patógenos. Este secreening se orienta pues a la obtención de las cepas bacterianas mas efectivas sobre la fisiología de la planta y que posteriormente podrán utilizarse con fines aplicados.

A continuación, Las cepas así seleccionadas pasan a estudiarse por su capacidad para inducir resistencia sistémica en plantas de tomate, especie elegida como modelo de trabajo. La importancia de este tipo de estudios no solo radica en que las cepas son capaces de proteger a las plantas mediante la mejora de su respuesta inmune, lo que define un enorme potencial de aplicación en sistemas de producción intensivos, sino que además la inducción de las respuestas defensivas innatas de la planta va asociada con la producción de metabolitos secundarios implicados en la defensa y que son de gran interés para su aplicación medicinal y alimentario. Esta solución biotecnológica, en principio orientada a mejorar los sistemas defensivos de la planta, solapa por lo tanto con una aplicación de un enorme interés, el desarrollo de alimentos fortificados, alimentos funcionales, o alimentos de mayor calidad con menor aporte de pesticidas y fertilizantes (Capanoglu, 2010).

En una segunda etapa, descrita en el apartado 2.2, una vez comprobada la capacidad de las cepas seleccionadas para proteger a las plantas del ataque de un patógeno modelo, es fundamental conocer los factores desencadenantes de la respuesta, y como ocurre la transducción de la señal a nivel fisiológico en la planta. La gran mayoría de los microorganismos patógenos como son, virus, hongos o bacterias, se detectados por la planta mediante el reconocimiento de señales producidas por los propios microorganismos. Estas señales inducen una respuesta de defensa en la planta y se consideran “elicitors”. Actualmente los elicitors se clasifican en dos clases, generales o no específicos y elicitors específicos (Montesano et al. 2003). El conocimiento de los factores capaces de disparar una respuesta defensiva en una planta son fundamentales para el posterior manejo de la misma. No sólo es fundamental conocer estos factores, sino también cómo ocurre la transducción de la señal a nivel fisiológico en la planta.

La detección de este tipo de elicitors, conlleva la activación del sistema de resistencia basal, primario, reconocido como PTI (PAMP Triggered Immunity), Por otra parte, y en un intento de sobrevivir, ciertos patógenos son capaces de secretar “efectores” que inhiben la PTI, lo que resulta en un eficiente proceso de infección; estos “efectores” se conocen como factores de avirulencia (avr). Las plantas a su vez, han evolucionado para contrarrestar esta situación, diseñando un sistema de reconocimiento de los factores de avirulencia mediado por receptores que están codificados por genes de resistencia (R). El disparo de este proceso, implica la síntesis de proteínas de Resistencia, “Pathogenesis Related” (PR), que confieren a la

planta una resistencia secundaria más específica denominada ETI (Effector Triggered Immunity) (Jones et al. 2006; Guillaume et al. 2012), junto con los metabolitos secundarios, fitoalexinas, de interés, como ya se ha comentado anteriormente, por su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.

La demostración de una respuesta defensiva sistémica mediada por una trasducción de señales, con las implicaciones indicadas, permite abordar en los dos siguientes apartados (2.3 y 2.4) la aplicación de las cepas, de los MAMPs y de los efectores o elicitores metabólicos en la inducción de respuestas mediadas por metabolitos secundarios. El desarrollo de estos dos apartados está orientado, por una parte a comprobar la capacidad de las cepas bacterianas o sus elicitores para desencadenar respuestas en otras especies, por otra a comenzar la identificación de los elicitores, estructurales o metabólicos y por último a determinar la tecnología de aplicación adecuada ya sea en planta o en cultivos celulares.

Basándonos en las razones expuestas anteriormente, se propone la rizosfera de *N. glauca* como fuente de microorganismos seleccionados por la planta que podrían ser candidatos para los fines propuestos; inducción del metabolismo defensivo y/o la mejora general del crecimiento, promoción del crecimiento. Sobre las casi mil cepas aisladas de la rizosfera, a lo largo de dos años, en tres suelos de características muy diferentes, se realiza un ensayo previo de actividades con potencial para incidir favorablemente sobre la salud de la planta.

Casi un 10% (96) fueron capaces de producir sideróforos y de estas solo 62 fueron capaces de producir quitinasas in vitro. No existe ninguna prueba in vitro capaz de discriminar el posible potencial de las cepas aisladas para disparar respuestas defensivas. Su capacidad en este sentido depende de aspectos fundamentalmente evolutivos (Erbs y Newman 2011). Las plantas se enfrentan a un vasto espectro de microorganismos patógenos que liberan moléculas tanto estructurales como productos del metabolismo (Bari and Jones, 2009). El reconocimiento de estructuras conservadas implicadas en las respuestas del tipo PTI (PAMP-Triggered Immunity) (o de efectores desencadenantes de respuestas ETI (Effector-Triggered Immunity)), no tienen por qué ir ligadas a la producción de sideróforos o quitinasas, aunque sin duda pueden ser factores desencadenantes (Ran et al., 2005, Jung, et al., 2007, Ent et al., 2009). Sin embargo considerar estas capacidades aporta un valor añadido desde el punto de vista funcional y metabólico, además este criterio puede ayudar a seleccionar cepas mas especializadas como resultados de los procesos de selección impuestos por el sistema.

Las PGPR pueden mejorar el estado general de salud de la planta por diferentes mecanismos, incluyendo la movilización de nutrientes, la alteración del balance hormonal de la planta y la inducción específica de respuestas defensivas (Bowen and Rovira, 1999; van Loon et al., 2006; Ramos Solano et al., 2008a). Sin embargo la simple ocupación de nicho en raíces de plantas en sistemas agrícolas sometidos a monocultivos sistemáticos, o en invernaderos en condiciones de hidroponía en los que las raíces libres de microorganismos quedan expuestas a la colonización sin competencia de microorganismos patógenos (Bari

and Jones, 2009), ya constituye una propiedad que puede mejorar claramente el “fitness” de la planta. Y en este sentido el criterio de selección previo basado en la capacidad de las cepas, procedentes del screening, para producir quitinasas o sideróforos es no solo de interés por su relación con las posibilidades de protección de las plantas (Gang et al., 1991, Cattelan et al., 1999; Adesina et al., 2007), sino también con aspectos relacionados con la competencia con microorganismos patógenos y su capacidad para limitar su crecimiento (Bevivino et al., 1998). La quitina es un polímero lineal, el mayor componente estructural de la mayoría de las paredes celulares fúngicas, razón por la que muchos microorganismos y plantas producen enzimas quitinolíticas para autoprotegerse contra los hongos, los microorganismos con esta capacidad se comportan como agentes de biocontrol (Lorito et al., 1993; Sid et al., 2003; Adesina et al., 2007). Con estos criterios los beneficios se pueden alcanzar desde tres niveles: i) colonización de nicho (Lucas García et al., 2004), ii) previniendo el crecimiento del patógeno por quelación de hierro y/o por hidrólisis de las paredes celulares fúngicas (Lorito et al., 1993; Chernin et al., 1995; Adesina et al., 2007), y iii) induciendo resistencia sistémica, activando los mecanismos defensivos de la planta (van Loon et al., 1998; Ramamoorthy et al., 2001, Ramos-Solano et al., 2010a).

El hecho de que todos los aislados que se ensayaron en plantas de tomate fueran capaces de mejorar el crecimiento de las plantas en al menos uno de los parámetros analizados, indica que la planta selecciona microorganismos beneficiosos y que estos, además, son reconocidos por una planta relacionada filogenéticamente como el tomate. Este es un primer paso, importante, ante de desarrollar experimentos posteriores en los que se busca la interacción de bacterias con plantas alejadas desde un punto de vista filogenético. En los apartados 2.3 y 2.4 se estudia el efecto de las bacterias capaces de generar respuestas en tomate en *Hypericum perforatum* y en *Glicine max*. Los resultados de estos experimentos, que se discuten mas adelante, demuestran la inespecificidad de la interacción, al menos desde la perspectiva estudiada. Esta observación debe ser tomada con las debidas precauciones tras considerar el aspecto que menciono a continuación. Los factores determinantes del disparo de respuestas sistémicas pueden estar extraordinariamente conservados (Erbs y Newman, 2012), pequeños péptidos como flg22 y elf18, proteínas tipo flagelina (Zipfel et al., 2004) y factores de transcripción como RNP-1 (Felix and Boller, 2003), se sabe que presentan la estructura mínima para comportarse como MAMPs, y son proteínas con estructuras muy conservadas, y lo mismo se puede decir de algunos fragmentos de glycopolímeros, lipopolisacáridos y glicopéptidos (Guillaume et al., 2012). Este grado de conservación permite un amplio rango de reconocimiento por proteínas receptoras, incluso que estos efectores puedan ser reconocidos como determinantes de patogenicidad en mamíferos (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996; Medzhitov et al., 1997). Los experimentos realizados en plantas de *Hypericum perforatum* y en *Glicine max*, confirman este hecho, por lo que la hipótesis inicial basada en proximidades filogenéticas en cuanto a los microorganismos seleccionados por *Nicotiana glauca*, pierde peso en relación con las hipótesis relacionadas con la presión selectiva impuesta por la planta y un amplio rango de actuación basado en el reconocimiento de receptores

especializados en el reconocimiento de estructuras altamente conservadas (Erbs y Newman, 2012) .

De entre las cepas bacterianas ensayadas se presta especial atención a aquellas que modifican los tres parámetros biométricos considerados (peso fresco, altura y calibre del tallo), tanto en cuanto a capacidad de estimulación como de inhibición, y con fuerte producción de quitinasas. Las cepas fueron: N5.18, N6.8, N11.37, N21.4, N17.35, N19.27, y todas ellas se ensayan en tomate para comprobar su capacidad de protección en tomate frente a *Xanthomonas campestris*. La secuenciación del 16s rDNA (Figura 2, apartado 2.1) muestra que las cepas pertenecen a 3 géneros bacterianos muy representativos de especies PGPRs que aunque demuestran posibles mecanismos de acción muy diferentes en cuanto a promoción de crecimiento pueden responder a un modelo común en cuanto a los mecanismos de inducción de resistencia sistémica (Marten et al., 2001; Gutierrez Mañero et al., 2001; Sid et al., 2003)

Es interesante la relación entre los resultados de promoción de crecimiento con los de protección frente al patógeno en ensayos de inducción de resistencia sistémica. La planta elegida para estos ensayos se trata de tomate, la misma especie en la que se realizan los ensayos de promoción de crecimiento, y el patógeno *Xanthomonas campestris*. No se aprecia una relación entre la capacidad de protección de las cepas y su capacidad para estimular el crecimiento. Todas las cepas fueron capaces de inducir resistencia sistémica, excepto N19.27 (Figura 1, apartado 2.1), bajo cuyo efecto se observa incluso un incremento de los síntomas de la enfermedad y todas las cepas fueron capaces de promover de alguna manera el crecimiento, excepto N21.4, que indujo una disminución significativa de todos los parámetros estudiados. Por lo tanto no se observa una relación entre el efecto sobre el crecimiento, la defensa de la planta y la capacidad para producir sideróforos o quitinasas. A partir de estos resultados podemos proponer un tipo de Elicitación basada en la producción de efectores o MAMPs estructurales independientes desde un punto de vista funcional con la producción de metabolitos implicados en mecanismos de biocontrol.

Los resultados que se presentan en los apartados posteriores nos muestran un efecto semejante pero con ciertas variaciones en *Solanum lycopersicum* y el *Arabidopsis thaliana*. Las 6 cepas ensayadas en *Arabidopsis thaliana* (apartado 2.2), muestran capacidad para estimular el crecimiento excepto la cepa N6.8, que se comportaba mejor en plantas de tomate, ya que en esta planta las diferencias con respecto al control fueron significativas. Sin embargo la cepa N21.4 en *Arabidopsis thaliana* no presentaba un efecto inhibitor. Con respecto a su capacidad de protección, todas las cepas presentaban un efecto de protección significativo en las dos plantas, excepto N19.27 en tomate. Por lo tanto podemos indicar que salvo la excepción de N21.4 todas las cepas presentan tendencias semejantes en ambas plantas. Sin embargo en *Hypericum perforatum*, solo la cepa N5.18, presenta un efecto claro de promoción de crecimiento en planta entera. Sin duda estos resultados sugieren mecanismos de acción variables según el binomio planta-microorganismo (Bari and Jones, 2009), aunque en todos los casos mediados por elicitores.

El caso de N21.4 merece una atención especial. van Hulten et al, (2006) describe un efecto de protección en cepas especialmente eficaces, acompañado de un efecto inhibitor del crecimiento de las plantas, lo que denomina el balance coste beneficio del efecto “priming”. El efecto de protección del tipo “priming”, que no deja de ser un efecto basado en una respuesta inmunológica innata (Conrath et al., 2002), el resultado del desvío de recursos energéticos de la planta al generar un estado de alarma previo a la llegada del patógeno determina un menor crecimiento de la misma. Los cambios metabólicos sistémicos generados en las plantas proporcionan una ventaja fisiológica que se manifiesta en una respuesta defensiva mucho mas acusada que la observada en plantas que no han sido estimuladas previamente. Todo parece indicar que esta cepa dispara la respuesta sistémica en la planta a través de mecanismos que implican un coste/beneficio, y desde luego todo indica que los mecanismos implicados son variables según la cepa. Esto esta apoyado por los resultados obtenidos en el apartado 2.2, en el que se muestra que las 6 cepas disparan respuesta sistémica en *Arabidopsis thaliana*, aunque como ya se ha indicado anteriormente con distinta intensidad (Figura 3, apartado 2.2) Además también se demuestra, mediante el empleo de mutantes NahG, *etr1-1* and *jar1-1* como las cepas N6.8 y N11.37, que son las dos cepas que mas reducen los síntomas de la enfermedad frente al ataque del patógeno, presentan vías de transducción de señales diferentes. La cepa N6.8 reduce significativamente los síntomas de la enfermedad en mutantes *etr1-1* and *jar1-1* (28 and 26%, respectivamente) con respecto al control (Figura 4, apartado 2.2). Sin embargo en plantas NahG plants, los síntomas de la enfermedad en plantas inoculadas tanto con N6.8 como con N11.37 fueron muy semejantes al control. Por otra parte N11.37 no indujo resistencia ni con mutantes *etr1-1* ni con plantas NahG, aunque los síntomas de la enfermedad se redujeron significativamente en el caso de los mutantes *jar1-1* (33%).

Los dos primeros apartados del capítulo 2 de la memoria parecen corroborar, que las cepas aisladas de la rizosfera de una planta, tienen mayoritariamente efectos beneficiosos sobre una planta filogenéticamente próxima, y que la capacidad de selección de cepas por parte de la planta es la base de los resultados obtenidos. No obstante los ensayos en planta modelo corroboran que la especificidad de la interacción en cuanto a los parámetros estudiados no es estricta, y asumiendo que los efectos se producen básicamente mediante el disparo de respuestas defensivas, parece preponderante el papel que pueden desempeñar los elicitores bien de tipo MAMPs, o efectores metabólicos, con las implicaciones que la conservación de zonas determinantes de la respuesta tienen en este sentido, muy probablemente causa fundamental de un amplio rango de efectividad de los elicitores implicados.

Por las razones expuestas, y como continuación de la hipótesis de partida, se realizaron ensayos en plantas filogenéticamente alejadas buscando la estimulación del metabolismo secundario implicado en la defensa de la planta. Sobre la base de un modelo basado en respuestas inducidas por MAMPs y/o efectores, orientamos la aplicación biotecnológica de los determinantes de las respuestas para mejorar la calidad nutricional de materias primas vegetales, o mejorar los niveles de metabolitos de interés para la industria farmacéutica y/o alimentaria.

El empleo de materias primas naturales como bancos de moléculas a partir de las cuales podemos desarrollar medicamentos, ha sido y sigue siendo de una importancia fundamental en el desarrollo del arsenal terapéutico actualmente disponible. La caracterización fitoquímica de los principios activos fundamentales en Hipérico permite relacionar a la hyperforina (un floroglucinol prenilado) y a la hypericina (una naftodiantrona) con los efectos mas importantes sobre la salud, aunque obviamente posee otros principios con actividad, como flavonoides y taninos. Aunque existen datos en la bibliografía sobre los posibles efectos antiretrovirales (Lavie et al., 1989; Chinsembu & Hedimbi, 2010) y antitumorales de la hyperforina (Medina et al., 2006), el efecto mas contrastado es la inhibición de la recaptación de serotonina hacia los axones presinapticos, mecanismo de acción en el que se asienta su efecto antidepresivo (Adam et al., 2002). Aunque se consideran fitoalexinas y agentes protección frente a luz UV (Boue et al., 2009) no se conoce el papel de estos compuestos en la defensa de la planta, pero además de las fluctuaciones debidas al genotipo (Büter, y Büter, 2002), las situaciones de estrés biótico y abiótico son potencialmente capaces de modificar los niveles de estos compuestos en la planta. El empleo de las cepas bacterianas previamente ensayadas en *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*, y su amplio espectro de actuación, nos permite deducir su papel como MAMPs y/o efectores y por lo tanto su potencial de uso sobre Hipérico con el objeto modificar/estabilizar los niveles de hypericina. La fluctuación de la concentración de compuestos bioactivos en planta en el cultivo en condiciones naturales es uno de los problemas mas habituales que limita el uso de estos productos, tanto para su uso como medicamento como para su empleo como materia prima en la preparación de los mismos. El empleo de la técnica de elicitación en planta entera, puede proporcionar soluciones al respecto, pero además en cultivo in vitro; “shoot culture” se pueden controlar con mas precisión los factores ambientales y genéticos, permitiendo aún un mayor control de la producción. El uso de elicitors en cultivos celulares ya se había probado anteriormente en *H. perforatum* (Dias et al., 2001; Conceição et al., 2006), pero la técnica de “shoot culture” permite superar el problema de la falta de acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo de tejidos indiferenciados. En este caso concreto este tipo de cultivo permite generar en condiciones controladas el tejido especializado que se requiere para la síntesis y acumulación de estos metabolitos; glándulas secretoras (Kirakosyan et al., 2004). A continuación, la falta de estímulo que proporciona el ambiente natural, tratamos de suplirlo mediante la inoculación de las cepas bacterianas procedentes de *Nicotiana glauca* ensayadas en los dos primeros apartados. El comportamiento de estas cepas frente al metabolismo secundario, nos permite apoyar la hipótesis de su aplicación biotecnológica para optimizar la producción de metabolitos de interés.

La modificación del metabolismo secundario mediante la aplicación de bacterias PGPR, ya ha sido citada anteriormente en otras plantas, *Digitalis lanata* (Gutierrez Mañero et al., 2003) y soja (Ramos Solano et al., 2010b). En el primer caso los objetivos se centraron en productos terpénicos y en el segundo en compuestos fenólicos. Aunque en los primeros trabajos no se relacionaba el efecto con un mecanismo

mediado por MAMPs, ya en el segundo había un suficiente soporte experimental para considerar una mediación implicada en procesos defensivos. Por lo que la aplicación de estas cepas rizosféricas en Hipérico nos permitía validar una hipótesis apoyada en el amplio espectro de los factores desencadenantes de la respuesta y en que esta respuesta es de tipo sistémico y relacionada con la defensa.

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento y concentración de bioactivos en planta entera nos permiten corroborar esta hipótesis. Dos de las cepas ensayadas N5.18 y N21.4, dos de las cepas mas activas en los ensayos anteriores, presentamos también una fuerte actividad sobre el crecimiento de la planta y al mismo tiempo sobre la concentración de hipericina y pseudohipericina. Esta última en concentraciones de 2 a 3 veces superiores que la hipericina, como es habitual en hipérico (Poutaraud et al., 2001). Las respuestas fueron muy evidentes con ambas cepas.

Aunque un efecto de inhibición sobre el crecimiento puede ir directamente ligado al efecto ISR, como consecuencia del desvío de recursos energéticos al generar un estado de alarma previo a la llegada del patógeno (Conrath et al., 2002), hemos podido comprobar en las tres plantas empleadas, en esta memoria que la inducción de resistencia sistémica puede ir asociada tanto a una inhibición del crecimiento como a una estimulación. Todos los datos apuntan a que el desvío de recursos energéticos siempre se produce, tanto en un caso como en otro, sin embargo la complejidad de la interacción es muy superior a lo que se podría deducir de los factores implicados en la defensa. Así la hipótesis del efecto combinado hormonal, junto los efectos directamente relacionados con la eficacia fotosintética de la planta, y la mejora de la nutrición mineral, son en su conjunto factores a tener en cuenta que se deben considerar como procesos que interaccionan entre si que inciden de forma compleja en el efecto final observado.

El descubrimiento de la producción de auxinas por los microorganismos rizosféricos fue, inicialmente, un hito de gran importancia en el estudio de la interacción planta-microorganismos (Azcon & Barea, 1975; Gutiérrez Mañero et al., 1996; Hirsch et al., 1997). Hoy sabemos que la producción de auxinas es un hecho muy frecuente entre los microorganismos rizosféricos, incluso si consideramos compuestos auxinoides, como derivados del metabolismo del triptófano, podemos estar hablando de hasta un 90% de los microorganismos rizosféricos. Las implicaciones de este hecho son enormes en lo que se refiere al efecto sobre el crecimiento radical, y en consecuencia en lo que afecta a la capacidad de la planta para explorar el suelo y para nutrirse, lo que obviamente incide de manera decisiva en su crecimiento. La capacidad de producir auxinas puede producir tanto un efecto de inhibición como de activación, dependiendo del rango de concentración de auxinas que detecte la planta. Así en concentraciones del orden nanomolar el efecto suele ser de activación, mientras que a concentraciones mayores suele ser de inhibición (Duca et al., 2014) El rango de concentración que detecta la planta no solo depende de la producción de auxinas o compuestos auxinoides, sino también de la capacidad de colonización e intimidad de la misma, pues podemos estar hablando de cepas endorizosféricas, capaces de colonizar las primeras capas celulares del sistema radical. Por otra parte no podemos descartar la producción de ACC desaminasa, datos no mostrados, ligada a la

producción de etileno, que a su vez interacciona directamente con el efecto auxínico a través del balance auxinas/etileno, (Glick et al., 2007). El aumento de la superficie radical en combinación con la producción de sideróforos puede mejorar decisivamente la nutrición relativa a este elemento y en consecuencia una mejora fotosintética que puede revertir el efecto típico del balance coste/beneficio. Este último aspecto, el relacionado con la fotosíntesis cobra una importancia vital. Trabajos recientes han demostrado un claro efecto de la eficiencia fotosintética por efecto de PGPR, por una parte en respuesta a un aumento de la concentración de clorofilas, relacionada con la mejora de la nutrición férrica, y por otro por una supresión de las señales de control de la fotosíntesis, mediante el control de señales en las que está implicado el ácido abscísico y la señal dependiente de hexokinasa (Zhang, H., et. al., 2008).

En bacterias de vida libre, la producción de Giberelinas solo ha sido descrita en dos cepas de *Bacillus* (Gutiérrez Mañero et al., 2001), es frecuente en bacterias fijadoras de nitrógeno, aunque en este caso la producción es mucho menor. Aunque en estas cepas es muy poco probable la producción de Giberelinas, no se ha ensayado, cuando se produce también puede ser un factor de estimulación de la fotosíntesis a través de un aumento de la superficie foliar.

Por todo lo expuestos estas cepas parecen actuar a través de señales hormonales moduladoras del crecimiento, contrarrestando el balance energético negativo generado por la inducción sistémica de resistencia, en conjunto con una mejora de la eficacia fotosintética a través de la mayor disponibilidad de clorofilas junto con una señal de inhibición de la señal de bloqueo de la fotosíntesis. Las señales hormonales relacionadas con el salicílico y el ácido jasmónico intervendrían en los procesos de transducción de la señal de la ISR como se ha demostrado en el apartado 2.2.

En relación con la producción de metabolitos secundarios, en este caso de tipo fenólico, no es descartable un efecto multifásico en el que este involucradas hormonas junto con otros elicitores (Gutierrez Mañero et al., 2001; Ramamoorthy et al., 2001). Tenemos datos en cuanto al efecto de los reguladores de crecimiento como metabolitos responsables también de provocar modificaciones del metabolismo secundario. Se ha demostrado que las auxinas, el ácido salicílico y el ácido jasmónico son capaces de alterar el metabolismo de compuestos fenólicos en cultivos celulares mediante aplicación exógena (Dias et al., 2001; Conceição et al., 2006) y en plantas también mediante aplicación exógena (Poulev et al., 2003).

Aunque los efectos sobre la producción de hipericina y pseudohipericina fueron parecidos con las dos cepas capaces de modificar las concentraciones de estos metabolitos, se selecciona la cepa N5.18 para continuar con los ensayos en "shoot culture" debido al significativo efecto que tuvo esta cepa sobre el peso total de las plantas. A partir de esta cepa se obtienen tres tipos de elicitores en función de su peso molecular y solubilidad (fracción 1 soluble en acetona, fracción 2 soluble en agua menor de 10 KDa y fracción 3 soluble en agua y mayor de 10 KDa). Los elicitores empleados en este caso se concretan en los fragmentos liberados a los medios de cultivo. Kirakosyan et al. (2000b), demuestra que los mananos procedentes de paredes

fúngicas son capaces de estimular la producción de hipericinas en cultivos celulares, y ya se ha indicado anteriormente el papel de los fragmentos de paredes o cubiertas celulares liberados al medio en el disparo de los sistemas de inmunidad innata (Erbs, y Newman, 2011). Nuestros resultados son consistentes con los de Kirakosyan et al., de 2000b en cuanto los niveles de hipericina y pseudohipericina y además demuestran un potente efecto biológico de los elicitores presentes en las tres fracciones, variando en cada caso en función de la concentración, lo que sugiere la posible presencia de moléculas distintas en cada fracción y distintos tipos de receptores desencadenantes de la respuesta, aunque no podemos descartar agregaciones moleculares como las propuestas por Erbs, y Newman (2011) para moléculas del tipo lipopolisacáridos que pueden modificar la respuesta dosis dependiente, también encontrada para oligosacarinas (Yamaguchi et al., 2000). Los resultados obtenidos en los experimentos de elicitación confirman la actividad de las cepas seleccionadas. Resulta de especial interés la cepa N5.18, debido a que en todos los casos, además de demostrar capacidad para promover el crecimiento, es capaz de inducir el metabolismo secundario a través de metabolitos y/o determinantes estructurales de al menos tres tipos, y en concentraciones muy bajas.

A la vista de los resultados obtenidos, debido a la actividad de los materiales, tanto cepas bacterianas como elicitores, nos planteamos como alternativa de aplicación de la elicitación en plantas, la mejora de la calidad nutricional de productos vegetales, bien para su consumo directo o bien para la obtención de materia prima para el desarrollo de alimentos funcionales. Las isoflavonas, son en estos momentos uno de los productos del metabolismo vegetal, fitonutrientes, con más demanda, tanto para la fabricación de alimentos funcionales como para la preparación de productos galénicos. La materia prima fundamental para la obtención de isoflavonas son las propias semillas de soja, que se utilizan para preparar extractos o directamente en pulverizados. Esta es la razón por la que se elige este material de trabajo.

Aunque la aplicación de elicitores es un procedimiento biotecnológico que va cobrando cada vez mayor importancia, la aplicación directa de la bacteria en un producto de consumo humano requiere una cautelosa evaluación de la toxicidad potencial, ya que, aunque la cepa bacteriana, se ha aislado de ecosistemas naturales y no ha sufrido ninguna modificación genética, sí existen cepas bacterianas aisladas de rizosfera que pueden desencadenar enfermedades en humanos por ejemplo cepas bacterianas del género *Pseudomonas*, *P. fluorescens* se ha descrito una posible capacidad patogénica de carácter oportunista (Picot et al., 2001; Madi et al., 2010). Por lo tanto, la alternativa más viable es el empleo de los determinantes de la elicitación. El procedimiento de aplicación a través de una incisión en la semilla, es un procedimiento que podría trasladarse a la industria fácilmente y los resultados indican que el estrés producido por la incisión no altera las concentraciones iniciales de isoflavonas (Tablas 1, 2 y 4, apartado 2.4). Boue et. al., (2009) ya demostró que la elicitación con patógenos es efectiva en términos semejantes a los que encontramos con PGPR, lo que sugiere un efecto bien de moléculas de superficie del tipo MAMPs, o bien de moléculas resultantes del metabolismo bacteriano liberadas al medio, efectores o MAMPs.

La importancia de este apartado integrado en la memoria, no solo se fundamenta en la aplicación biotecnológica de la elicitación sino en la relación de la misma con los sistemas defensivos de la planta, ya que el conocimiento de los mecanismos metabólicos básicos del proceso permitirá un manejo adecuado con aplicaciones en ambos aspectos; la defensa de la planta y producción de metabolitos de interés.

El incremento detectado en los fenoles totales (Figura 6, apartado 2.4) no se refleja en los flavonoides totales (Figura 7, apartado 2.4), y sin embargo, si se detecta, en general, un incremento en IF totales (Figura 3, apartado 2.4). La modificación diferencial de los marcadores utilizados indica que los MAMPs de N5.18 están induciendo la ruta del ácido sikimico en diferentes puntos de la misma; el incremento en fenoles totales sugiere una diana en puntos muy iniciales dentro de esta ruta ya que es un incremento general de compuestos fenólicos. El incremento limitado en flavonoides totales acompañado de un incremento en IF totales y modificación de las especies químicas de ambas familias de IF indica que la ruta se desvía a compuestos defensivos de tipo isoflavona, que actuarían como fitoalexinas, siendo los flavonoides las fitoanticipinas (Boue et al 2009; Capanoglu 2010; García-Seco et al 2012).

El comportamiento diferencial de los distintos tipos de elicitación (densidad bacteriana/inactivación de las células) sugiere que el efecto está mediado por receptores PRRs (pathogen- or microbe- recognition receptors) (Erbs and Newman, 2012). El amplio y variable rango de actuación de los determinantes bacterianos (MAMPs) implicados en el reconocimiento de receptores, coincide con los resultados obtenidos en la elicitación de hipérico y que se relacionó con los sistemas de baja afinidad de las plantas para detectar MAMPs de tipo LPS (Zeidler et al 2004) y con la capacidad de agregación de los determinantes de naturaleza anfipática (Aslam et al 2009).

Por otra parte, la hipótesis planteada en experimentos de apartados anteriores se confirma, pues en términos generales, encontramos efectos tanto cuando se aplican cepas vivas como inactivadas con UV, por lo tanto, se puede descartar que el efecto sea debido a productos del metabolismo liberados al medio cuando la cepa está viva, y el efecto se concreta sobre la base de determinantes estructurales.

Los cambios detectados en las distintas especies de isoflavonas conducen a un aumento final de isoflavonas totales. Teniendo en cuenta la interconversión de las distintas especies (conjugado-aglicón), un aumento de la concentración del aglicón asociado a una disminución en los conjugados, eliminaría la posibilidad de una síntesis *de novo*, y por el contrario el aumento del aglicón manteniendo los niveles de conjugados constantes o aumentados sugiere una síntesis *de novo*. Dado que las IF aumentan debido a un aumento en los aglicones y en los malonilderivados (Tabla 3.a, apartado 2.4), principales formas de acumulación (Mackenbrock et al., 1992), se concluye que la elicitación determina síntesis *de novo* muy probablemente debida a factores de elicitación relacionados con moléculas de superficie, como LPS, ya citados como elicitors en otras bacterias Gram negativas como por ejemplo *Chryseobacterium balustinum* Aur9 (Ramos-Solano et al., 2008b).

El potencial antioxidante mejora mediante elicitación en cuanto al potencial de inhibición de la oxidación de β caroteno (Figura 5, apartado 2.4). La bibliografía en este sentido son bastante confusos, porque mientras unos autores relacionan el potencial antioxidante con el contenido total de fenoles Xu y Chang (2008), otros, Boué et. al. (2008), encuentran una relación directa entre IF y potencial antioxidante. Nuestros resultados indican que la elicitación altera la cantidad total de fenoles y estos resultados se relacionan con los potenciales antioxidantes obtenidos. Los Flavonoides, quedan como estructuras metabólicas de paso hacia las fitoalexinas, isoflavonas, relacionándose este último aspecto con el papel demostrado de esta cepa en la defensa de la panta en relación con el papel de los MAMPs procedentes de N5.18.

Bibliografía

Adam P., Argioni D., Bacher A., Eisenreich W. 2002. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. J Med Chem, 45: 4786-4793.

Adesina M.F., Lembke A., Costa R., Speksnijder A., Smalla K. 2007. Screening of bacterial isolates from various European soils for in Vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. Soil Biol Biochem, 39:2818-2828.

Bari, R., Jones, J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology, 69(4), 473–488.

Barriuso, J., Pereyra, M.T., Lucas García, J.A., Megías, M., Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B. 2005. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-pinus* sp. Microb Ecol, 50 (1): 82-89.

Berendsen, R.L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, 17(8), 478–486.

Bevivino A., Sarrocco S., Daimastri C., Tabacchioni S., Cantale C., Chiarinin L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. FEMS Microb Ecol, 27(3): 225-237

Boue S.M., Cleveland T.E., Carter-Wientjes C., Shih B.Y., Bhatnagar D., Mclachlan J.M., Burow M.E. 2009. Phytoalexin-enriched functional foods. J Agric Food Chem, 57: 2614–2622.

Bowen, G.D., rovira, A.D. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. En: Plant Roots-The Hidden Half, (Y. Waisel, A. Eshel y U. Kafkafi, eds.). Marcel-Dekker, Nueva York. 641-649 pp.

Büter, K. B., Büter, B. 2002. Ontogenetic Variation Regarding Hypericin and Hyperforin Levels in Four Accessions of *Hypericum perforatum*L. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 9(2-3): 95–100.

Capanoglu, E. 2010. The potential of priming in food production. Trends Food Sci Technol, 21(8): 399-407

- Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. 1999. Screening for Plant Growth-Promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J*, 63: 1670-1680.
- Chernin L., Ismailov Z., Haran S., Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1720-1726.
- Chinsembu K.C., Hedimbi M. 2010. Ethanomedical plants and other natural products with anti-HIV active compounds and their putative modes of action. *IJBMBR*, 1: 74-91.
- Conceição L.F.R., Ferreres F., Tavares R.M., Dias A.C.P. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67: 149-155.
- Conrath U., Pieterse C.M.J., Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7: 210-216.
- Dias A.C.P., Seabra R.M., Andrade P.B., Ferreres F., Ferreira M.F. 2001. Santhone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *J Plant Physiol*, 158: 821-827.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1):85-125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y
- Ent, S. V. D., Wees, S. C. M. V., Pieterse, C.M.J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1581-1588.
- Erbs, G., Newman, M.A. 2011. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol*, 13(1): 95-104.
- Felix G., Boller T., 2003. Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.*, 278: 6201- 6208.
- Henry, G., Thonart, P., Ongena, M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16(2): 257-268.
- Gutierrez Mañero F.J., Ramos Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., Talon M. 2001. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum*, 111: 1-7.
- Gutiérrez Mañero F.J., Ramos B., Lucas García J.A., Probanza A., Barrientos Casero M.L. 2003. Systemic induction of terpenic compounds in *D. lanata*. *J Plant Physiol*, 160: 105-130.
- Gang W., Kloepper J.W., Tuzun S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol*, 81(12):1508-1512
- Garbeva, P., van Veen J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial

populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol*, 42: 243–270.

Forrester. M. 2014. Neonicotinoid insecticide exposures reported to six poison centers in Texas. *Hum Exp Toxicol*, 33(6):568-573.

Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257.

Hashimoto, C., Hudson, K.L. Anderson, K.V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal–ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269–279.

Kirakosyan A., Gibson D.M., Sirvent T. 2004. A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as sources of hypericins and hyperforins. *J Herbs Spices Med Plants*, 10, 73-88.

Lavie G., Valentine F., Levin B., Mazur Y., Gallo G., Lavie D., Weiner D., Meruelo D. 1989. Studies of the mechanisms of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 5963-5967.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973–983.

Lorito M., Di Pietro A., Hayes C.K., Woo S.L., Harman G.E. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 83: 721-728.

Lucas García, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F.J. 2001. Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs. *J Plant Nutr Soil Sci*, 164:1-7.

Lucas García J.A., Probanza A., Ramos B., Ruiz Palomino M., Gutiérrez Mañero F.J. 2004. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agric Environ (formerly Agronomie)* 24: 169-176.

Madi, A., Svinareff, P., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Connil, N. 2010. *Pseudomonas fluorescens* alters epithelial permeability and translocates across Caco-2/TC7 intestinal cells. *Gut Pathog*, 2:16.

Marilley, L., Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol*, 13:127-136.

Marten, P., Brueckner, S., Berg, G. 2001. Biological plant protection using rhizobacteria – an environmental friendly alternative for biological control of soilborne and seedborne phytopathogenic fungi. *Gesunde Pflanzen* 53: 224-234.

Mavrodi, O. V., Mavrodi, D. V., Parejko, J. A., Thomashow, L. S., Weller, D. M. 2012. Irrigation differentially impacts populations of indigenous antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3214–3220. doi: 10.1128/AEM.07968-11.

Medina M.A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I., Quesada, A.R. 2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*, 79,105-111.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr, C.A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394–397.

Montesano M., Brader G., Palva E.T., 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 4, 73-79.

Jones J.D.G., Dangl J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.

Jung, W.J., Mabood, F., Kim, T. H., Smith, D.L. 2007. Induction of pathogenesis-related proteins during biocontrol of *Rhizoctonia solani* with *Pseudomonas aureofaciens* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) plants. *BioControl*, 52(6), 895–904.

Picot, L., Abdelmoula, S.M., Merieau, A., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., Feuilloley, M.G. 2001. *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect*, 3: 985-995.

Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B., Kneer, R., Cragg, G.M., Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J Med Chem*, 46 (12): 2542-2547.

Poutaraud A., Di Gregorio F., Tin V.C., Girardin P. 2001. Effect of light on hypericins contents in fresh flowering top parts and in an extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med*, 67, 254-259.

Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11.

Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Gutiérrez Mañero, F.J. 2008a. Physiological and molecular mechanisms of PGPRs. En: *Plant-Bacteria interactions. Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahamd, I., Pichtel, J., Hayat, S. (eds.). Wiley, New York. 41-54.

2008b

Ramos-Solano, B., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., Algar, E., García-Cristobal, J., & Gutierrez Mañero, F.J. 2010. Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil*, 334(1-2), 189–197.

Ramos Solano B., Algar E., García-Villaraco A., García Cristóbal J., Lucas García J., Gutiérrez Mañero F.J. 2010a. Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. Osumi. *J Agric Food Chem*, 58, 1484–1492.

Ran, L.X., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. 2005. No role for bacterially produced salicylic Acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*, 95(11), 1349–1355.

Sid, A., Ezziyyani, M., Egea-Gilabert, C., Candela, M.E. 2003. Selecting bacterial strains for use in the

biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biologia plantarum* 47(4): 569-574.

Tomizawa, M., Casida, J.E. Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. 2011. *J Agric Food Chem.* 59(7), 2883–2886. doi:10.1021/jf103856c

Van Loon L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36: 453-483.

van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44:135-162.

Zipfel C. et al., 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428, 764-767.

Conclusiones

1. La fuerte presión selectiva en la zona rizosférica determina la aparición de cepas bacterianas capaces de mejorar la fisiología de la planta, estimulando diferentes rutas del metabolismo secundario y permitiendo una mejora de la respuesta de la planta frente a diversas situaciones de estrés.
2. Excepto la cepa N19.27, una fuerte estimuladora del crecimiento vegetal, todas las cepas procedentes del screening rizosférico en *Nicotiana glauca* fueron capaces de mejorar la resistencia de plantas de tomate frente al patógeno *Xantomonas campestris* CECT 95.
3. Todas las cepas seleccionadas de la rizosfera *Nicotiana glauca* fueron capaces de inducir protección en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y las dos más eficaces demostraron un mecanismo de acción mediado por modelos moleculares asociados a patógenos mediante mecanismos de resistencia sistémica inducida.
4. Las vías de inducción de resistencia sistémica no se ajustaron al modelo definido para la transducción de señal mediada por salicílico o por jasmónico/etileno.
5. La respuesta sistémica inducida puede ir mediada en la transducción de la señal por un cruce e interacción de reguladores del crecimiento y segundos mensajeros de estructura mas compleja que el modelo definido por las dos vía indicadas.
6. Tras el ensayo de las cepas aisladas del microbioma vegetal de *Nicotiana glauca* en distintas especies vegetales pertenecientes a distintas familias, se puede indicar un amplio espectro de actuación sobre el crecimiento vegetal y el metabolismo secundario.
7. Los ensayos realizados con *Hypericum perforatum* indican que los efectos biológicos observados se deben a interacciones definidas sobre la base de modelos moleculares asociados a microorganismos rizosféricos al nivel de elicitores moleculares tanto estructurales como metabólicos.

8. La aplicación de elicitores metabólicos en cultivos celulares de tejidos (shoot cultures) presenta un efecto diferencial con respecto a la aplicación de bacteria en planta entera en lo que se refiere a la producción de biomasa, sin embargo en ambos casos se aprecia a la inducción del metabolismo secundario con incrementos en la producción de pseudohipericina.
9. Las semillas de soja tratadas con elicitores, cepa bacteriana tanto en su forma viable como no viable, resultó ser efectiva en la estimulación del metabolismo de IF. Dicha estimulación generó un aumento en la concentración de IF y en el potencial antioxidante medido como prevención de la oxidación del β -Caroteno.
10. Los determinantes responsables de la estimulación del metabolismo de isoflavonas en semillas pregerminadas de soja deben ser moléculas estructurales de superficie que actúan a través de receptores PRRs (pathogen- or microbe- recognition receptors).

Bibliografía general
